CAMILA MUSUMECCI GUIMARÃES AZZI

**Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido
por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett).**

São Paulo

2017

CAMILA MUSUMECCI GUIMARÃES AZZI

**Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido
por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama

De acordo:

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3546
FMVZ

Azzi, Camila Musumecchi Guimarães

Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett). / Camila Musumecchi Guimarães Azzi.
– 2017.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama.

1. Cirurgia. 2. Massa óssea. 3. Ovário. 4. Modelo animal. 5. Hormônio. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise do potencial metastático ósseo das linhagens de câncer de mama MCF10A/CD90+ e HS578T/CD90- e seu papel na osteoporose em modelo animal", protocolada sob o CEUA nº 4918200715, sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/04/2017.

We certify that the proposal "Analysis of bone metastatic potential of CF10A/CD90+ e HS578T/CD90- breast cancer cell lines and their role in osteoporosis in animal model", utilizing 180 Heterogenics rats (180 females), protocol number CEUA 4918200715, under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/06/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **07/2017**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **180**

Linhagem: **Rowett**

Peso: **150 a 200 g**

Resumo: Previamente a este projeto foi realizado o silenciamento do gene CD90 na linhagem de mama tumorigênica HS578T e sua superexpressão na linhagem de mama não-tumorigênica HS578T. As linhagens celulares geradas foram caracterizadas quanto ao crescimento celular, potencial invasivo e metastático in vitro. Ensaios mostraram que a linhagem MCF10A/CD90+ teve um tempo menor de dobramento em relação à linhagem parental MCF10A, maior expressão dos marcadores mesenquimais e foram capazes de migrar e invadir mostraram a malignização. Em contraste, a linhagem que teve o gene silenciado HS578T/CD90- teve um tempo de dobramento maior que a parental HS578T, menor expressão dos marcadores mesenquimais e apresentou diminuição significativa da habilidade de migrar e invadir, mostrando um menor potencial metastático in vitro. Neste trabalho será realizada a análise do potencial metastático ósseo dessas linhagens in vivo e o papel destas células no modelo de osteoporose induzida por ovariectomia.

Local do experimento: biotério NETCEM-FMUSP. Os animais das linhagens Sprague-Dawley e Rowett serão fornecidos pelo biotério do IQ pois este biotério mantém a produção destas linhagens.

São Paulo, 10 de abril de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de um modelo alternativo de osteoporose em ratas induzida por ooforectomia.", protocolada sob o CEUA nº 4918200715, sob a responsabilidade de **Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/04/2017.

We certify that the proposal "Development of an alternative osteoporosis model in rats induced by oophorectomy.", utilizing 180 Heterogenics rats (180 females), protocol number CEUA 4918200715, under the responsibility of **Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/06/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **07/2017**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **180**

Linhagem: **Rowett**

Peso: **150 a 200 g**

Resumo: Previamente a este projeto foi realizado o silenciamento do gene CD90 na linhagem de mama tumorigênica HS578T e sua superexpressão na linhagem de mama não-tumorigênica HS578T. As linhagens celulares geradas foram caracterizadas quanto ao crescimento celular, potencial invasivo e metastático in vitro. Ensaios mostraram que a linhagem MCF10A/CD90+ teve um tempo menor de dobramento em relação à linhagem parental MCF10A, maior expressão dos marcadores mesenquimais e foram capazes de migrar e invadir mostraram a malignização. Em contraste, a linhagem que teve o gene silenciado HS578T/CD90- teve um tempo de dobramento maior que a parental HS578T, menor expressão dos marcadores mesenquimais e apresentou diminuição significativa da habilidade de migrar e invadir, mostrando um menor potencial metastático in vitro. Neste trabalho será realizada a análise do potencial metastático ósseo dessas linhagens in vivo e o papel destas células no modelo de osteoporose induzida por ovariectomia.

Local do experimento: biotério NETCEM-FMUSP. Os animais das linhagens Sprague-Dawley e Rowett serão fornecidos pelo biotério do IQ pois este biotério mantém a produção destas linhagens.

São Paulo, 29 de junho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 01 de junho de 2017

CEUA N 4918200715

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama (orientador)

Título da proposta: "Desenvolvimento de um modelo alternativo de osteoporose em ratas induzida por ooforectomia. ".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 23/maio/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Alteração de responsável, título e resumo Osteoporose é uma desordem esquelética caracterizada por diminuição na densidade óssea resultado em uma risco aumentado de fratura. A perda óssea ocorre em mulheres e homes devido ao processo natural de envelhecimento e representa um problema com grande impacto sócio-econômico. Neste trabalho nós pretendemos desenvolver um modelo alternativo de osteoporose em ratas por ooforectomia visando o uso de células humanas para a Medicina Translacional. Para esta finalidade, pretendemos: i) padronizar o modelo animal de osteoporose por ooforectomia, utilizando ratas Sprague Dawley de 12 semanas. A osteoporose será analisada por densitometria óssea em 0, 21, 45 e 60 dias após a cirurgia e por análises histológicas do fêmur. ii)) No segundo estágio do projeto, a osteoporose será induzida em ratas nude Rowett (NTacFCfqi; Nij-Whn) de 12 semanas e as mesmas análises descritas acima serão realizadas. and the same assays were conducted to detect osteoporosis. Com este projeto, pretendemos contribuir para a biologia da osteoporose usando um modelo animal alternativo que poderá contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos clínicos e terapêuticos. Este modelo imunodeficiente também permitirá a aplicação de células de outras espécies visando tratamento ou análises tumorais.".

Comentário da CEUA: "Os proponentes solicitam alteração de responsável pelo projeto, que passa a ser da Profa. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama, que já constava como orientadora da aluna de pós-graduação. Também é proposta alteração de título e do resumo, cuja justificativa está apresentada. ".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: AZZI, Camila Musumecci Guimarães

Título: **Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosemeire e Alvaro, por sempre me incentivarem a continuar estudando e a realizar meus sonhos e ao meu marido, Juan Tadeu, por ter ficado sempre do meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rosemeire Musumecchi e Alvaro Guimarães, pois foi através da vontade de voltar a estudar, seja em um curso técnico ou em uma faculdade, que eu comecei a dar valor ao estudo, a ser um profissional com um curso superior e a ver realmente como isso é importante. Também foi com eles que eu aprendi a ser batalhadora, a passar pelas dificuldades que aparecem pelo caminho de cabeça em pé e sempre com um livro por perto.

Agradeço ao meu marido, Juan Tadeu Azzi, pelas noites intermináveis em que eu passei chorando, pensando, desabafando ou ensaiando minhas apresentações do projeto. Cada conselho, pergunta e incentivo foram muito importantes para o meu amadurecimento e para me manter firme. Só posso agradecer pela sua paciência, pela sua confiança e por você ter sempre estado ao meu lado me dando apoio, sem você nada disso seria possível.

Agradeço a professora Dra. Mari Cleide Sogayar, pela oportunidade de começar minha carreira em seu laboratório e ter me fornecido os meios para crescer profissionalmente, cientificamente e pessoalmente. Foi graças a você que eu soube que meu lugar era em um laboratório de pesquisa.

Agradeço a minha orientadora Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira, por ter aceitado ser minha orientadora; você me orientou mais do que o necessário, sempre me ensinando, auxiliando, ajudando e me aconselhando, só posso dizer que nossas conversas foram muito produtivas. Obrigada por ter compartilhado o seu conhecimento comigo e por ser essa orientadora e profissional tão competente e dedicada.

Agradeço aos colegas do NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular), pelas ajudas, conversas, questionamentos e conselhos durante as reuniões ou na copinha, vocês ajudaram muito para que este projeto chegasse ao fim.

Agradeço especialmente a minha amiga Mariele Santos, que está comigo desde o início dessa caminhada. Obrigada por ajudar a aliviar o fardo quando tudo ficava difícil e pesado, pelos conselhos, conversas, risadas e brincadeiras; por tornar um simples almoço algo tão divertido pelo simples fato de dividirmos nossa comida. Você é uma joia rara que eu tenho muita sorte de poder chamar de amiga.

Agradeço ao Dr. Carlos DeOcesano Pereira, por ter ajudado a injetar as células de linhagens de mama nas ratas, pela paciência nos dias de coleta de tecido no biotério, pelos inúmeros conselhos em relação ao projeto e que caminhos percorrer, acho que você não percebe o quanto me ajudou a tomar várias decisões importantes.

Agradeço a Dra. Miriam Lemos, pelas técnicas ensinadas para se trabalhar com animais, pela ajuda no biotério em dias de coletas de sangue e tecidos, pelas ideias compartilhadas e por ter disponibilizado um pouco do seu tempo me ajudando nesse projeto.

Agradeço aos mestrandos, Gabriela Manini e Henrique César, por terem disponibilizado um pouco do tempo de vocês me ajudando no biotério em dias de coletas, tanto de sangue quanto de tecidos, vocês contribuíram muito.

Agradeço a mestranda Bruna Andrade Aguiar, pelas frequentes dúvidas em relação a pós que você ajudou a esclarecer e pela cantoria enquanto ficávamos horas no biotério realizando as coletas.

Agradeço a Carla Soares, por termos compartilhado a experiência do mestrado juntas, pelas conversas, desabafos e conselhos. Foi muito bom ter alguém que entendia o que eu estava passando ao meu lado.

Agradeço ao técnico do nosso biotério Alan, por ter ajudado a cuidar das ratas utilizadas no meu projeto.

Ao coordenador e professor José Roberto Kfoury, aos técnicos e funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Rose Eli Ricci, Ronaldo Agostinho, Jaqueline Santana

Agradeço ao Dr. Ricardo Pereira do Departamento de Reprodução Animal e ao seu aluno Marcel Henrique Blank pela ajuda com os experimentos de dosagem hormonal.

Ao CEFAP (Centro de Facilidades para a Pesquisa) agradeço por poder realizar a obtenção de imagens por raio-x dos animais, especialmente ao técnico Fernando Delgado Pretel.

Ao Biotério de Produção e Experimentação da FCV- Q/USP agradeço pela disponibilização dos animais utilizados neste projeto e pelas técnicas aprendidas, especialmente à Silvania M.P. Neves, à Flávia de Moura Prates Ong e à Renata Spalutto Fontes.

Aos funcionários e professores do Comitê de Ética da FMVZ/USP agradeço por sempre estarem dispostos a ajudarem a resolver as pendências dura projeto.

Agradeço ao CNPq e a Capes pela oportunidade de auxílio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram indireta ou diretamente para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.
(José de Alencar)

RESUMO

AZZI, CMG. **Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett)**. [Development of an animal model for osteoporosis induced by oophorectomy in nude female rat (Rowett)]. 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A osteoporose é um distúrbio esquelético caracterizado pela diminuição da força óssea, resultando em um risco aumentado de fratura. A perda óssea ocorre tanto em mulheres como em homens devido ao processo de envelhecimento natural [Drake *et al.*, 2015]. De acordo com o diagnóstico e classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a osteoporose é definida pela densidade mineral óssea (DMO) na coluna lombar ou quadril inferior a -2,5 do desvio padrão abaixo da média da DMO para uma população de jovens adultos [Cosman *et al.*, 2014]. Tem uma alta prevalência sendo mais freqüente do que a soma de casos de infarto do miocárdio, câncer de mama e acidente vascular cerebral. Essa doença deve ser considerada como um problema de saúde pública, pois afeta o indivíduo em sua função social, física e de trabalho e, portanto, causa impacto socioeconômico [Haddad *et al.*, 2015]. Neste trabalho, desenvolvemos um novo modelo de osteoporose em ratos nude por ooforectomia visando o uso de células humanas para a Medicina Translacional. Para tanto, foram estabelecidos dois passos e a osteoporose foi analisada por densitometria óssea aos 0, 21, 45 e 60 dias após a cirurgia e por análises histológicas de ossos femorais, i) padronização do modelo animal de osteoporose por ooforectomia, utilizando ratos Sprague-Dawley fêmeas de 12 semanas; ii) na segunda fase do projeto, a osteoporose foi induzida em ratos imunodeficientes nude Rowett fêmeas (NTacFCfiq: NIJ-Whn) de 12 semanas e os mesmos ensaios foram conduzidos para detectar a osteoporose. O soro foi coletado para a medida de estrogênio. As análises da DMO e histológicas mostraram modificação do conteúdo mineral e ósseos e da estrutura óssea, respectivamente, aos 60 dias após a cirurgia em ambas as linhagens de ratos fêmeas. Com este trabalho, pretendemos contribuir para a compreensão da biologia da osteoporose utilizando um novo modelo animal, o que pode levar ao desenvolvimento de novos protocolos clínicos e terapêuticos no futuro.

Palavras-chave: Cirurgia. Massa óssea. Ovário. Modelo animal. Hormônio.

ABSTRACT

AZZI, CMG. **Development of an animal model for osteoporosis induced by oophorectomy in nude female rat (Rowett).** [Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett)] 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by decreased bone strength resulting in an increased risk of fracture. Bone loss occurs in both women and men due to the natural aging process [Drake *et al.*,2015]. According to the World Health Organization (WHO) diagnosis and classification, osteoporosis is defined by the bone mineral density (BMD) in the hip or lumbar spine being less than or equal to -2.5 of the standard deviation below the BMD average for a population of young adults [Cosman *et al.*,2014]. It has a high prevalence being more frequent than the sum of cases of myocardial infarction, breast cancer and stroke. This disease should be considered as a public health problem, since it affects the individual in his social, physical and work function and, therefore, causes socioeconomic impact [Haddad *et al.*,2015]. In this work, we developed a new rat model of osteoporosis by oophorectomy aiming the use of human cells for Translational Medicine. To this end, two steps were established, i) standardization of the animal model of osteoporosis by oophorectomy, using female Sprague-Dawley rats at 12 weeks. The osteoporosis was analyzed by bone densitometry at 0, 21, 45 and 60 days after surgery and by histological analyzes of femoral bones. The serum was collected for measurement of estrogen markers; ii) at second stage of the project, osteoporosis was induced in immunodeficient female nude Rowett (NTacFCfiq: NIJ-Whn) at 12 weeks and the same assays were conducted to detect osteoporosis. Bone mineral density and bone histological analyzes showed changes in the of bone mineral content and bone structure, respectively, at 60 days after surgery in both rat lineages. With this work, we intend to contribute to the understanding of osteoporosis biology using a new animal model, which can lead to the development of new clinical and therapeutic protocols in the future.

Keywords: Surgery. Bone mass. Ovary. Animal model. Hormone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da remodelação óssea.....	26
Figura 2 - Critério densitométricos da Organização Mundial da Saúde (OMS)	31
Figura 3 - Padronização do procedimento de ooforectomia na linhagem Sprague-Dawley.....	45
Figura 4 - Padronização do procedimento de ooforectomia na linhagem nude Rowett.....	46
Figura 5 - Ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley com 60 dias após o procedimento de ooforectomia	49
Figura 6 - Raio x dos ratos fêmeas submetidas à análise de densitometria óssea: ratos Sprague-Dawley e nude Rowett.....	50
Figura 7 - Histologia do osso fêmur em ratos fêmeas Sprague-Dawley não-submetidas e submetidas à indução da osteoporose 60 dias após o início do experimento.....	60
Figura 8 - Histologia do osso fêmur em ratos fêmeas nude Rowett não-submetidas e submetidas à indução da osteoporose 60 dias após o início do experimento.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variação da massa corporal dos ratos fêmeas Sprague-Dawley submetidas aos procedimentos de ooforectomia	47
Gráfico 2 - Variação da massa corporal dos ratos fêmeas nude Rowett submetidas aos procedimentos de ooforectomia	48
Gráfico 3 - Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia	52
Gráfico 4 - Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia	54
Gráfico 5 - Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia	56
Gráfico 6 - Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia.....	51
Quadro 2 - Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia.....	53
Quadro 3 - Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia	55
Quadro 4 - Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitros
µm	Micrometro
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
cm	Centímetros
Cº	Celsius
CTC	Centro de Tecnologia Celular
DMO	Densidade mineral óssea
DPs	Desvios padrões
EFFO	<i>European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFs	Fatores de crescimento de fibroblastos
FLM	Microscópio de Luz com Fluorescência
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio folículo estimulante
g/cm ²	Gramas por centímetro quadrado
g/cm ³	Gramas por centímetro cubico
GH	Hormônios de crescimento
IGF-1	Fatores de crescimento de insulina 1
mg/dL	Miligramas por decilitro
mL	Mililitros
mm	Milimitros
MSC	Células-tronco mesenquimais
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NOF	<i>National Osteoporosis Foundation</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PFA	Paraformaldeído
PTH	Hormônio da paratireoide
RNTC	Rede Nacional de Terapia Celular
rpm	Rotações por minuto
SERMs	Moduladores seletivos de receptores de estrogênios

TGF- β	Fatores de crescimento transformante β
VEGF	Fatores de crescimento endotelial vascular
vs	Versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	FISIOPATOLOGIA DA OSTEOPOROSE.....	25
2.2	FATORES DE RISCO DA OSTEOPOROSE.....	29
2.3	TRATAMENTOS PARA OSTEOPOROSE.....	32
2.4	MODELOS ANIMAL PARA OSTEOPOROSE.....	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJEITO ESPECÍFICO.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	ANIMAIS	39
4.2	ENSAIO DE OSTEOPOROSE POR OOFORECTOMIA EM RATOS FÊMEAS SPRAGUE-DAWLEY E NUDE ROWETT.....	40
4.3	ANÁLISE DE DENSITOMETRIA MINERAL ÓSSEA.....	42
4.4	COLETA DE SANGUE E SORO.....	42
4.5	DOSAGEM DE 17 β -ESTRADIOL.....	42
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	MODELO DE OSTEOPOROSE EM RATOS FÊMEAS SPRAGUE-DAWLEY E NUDE ROWETT.....	44
5.1.1	Procedimento de ooforectomia	44
5.1.2	Análise da massa corporal	46
5.1.3	Análise da densidade mineral óssea (DMO).....	49
5.1.3.1	Conteúdo do volume ósseo (g/cm^3)	50
5.1.3.2	Conteúdo mineral ósseo (g/cm^2)	55
5.1.4	Análise da glicemia.....	59
5.1.5	Análise de estradiol.....	59
5.1.6	Análise histológica dos ossos fêmures.....	59
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICES.....	74

1 INTRODUÇÃO

Na sociedade atual há muitas desordens relacionadas ao envelhecimento devido ao aumento da expectativa de vida das pessoas, principalmente o aparecimento de fraturas osteoporóticas. No Brasil, temos hoje 20 milhões de idosos, sendo que cerca de 40% de mulheres e 15% de homens apresentam fraturas devido à osteoporose, e a perspectiva de idosos para 2040 é de 55 milhões de brasileiros com mais de 60 anos.

A osteoporose acomete tanto homens quanto mulheres, porém nas mulheres pode ser ocasionada devido à deficiência de estrogênio que ocorre quando as mulheres entram na menopausa. É conhecida como uma doença "silenciosa", já que algumas pessoas só percebem que têm a doença quando sofrem alguma fratura, sendo as fraturas de quadril as mais comuns. São poucas as pessoas que tratam a osteoporose, pois os custos são muito altos e os tratamentos não tão eficazes. Os fármacos presentes no mercado além de serem caros, possuem muitos efeitos colaterais, como febre, náuseas, refluxo gastroesofágico, formação de coágulos e até osteonecrose da mandíbula, além de necessitarem de aplicação em várias doses. Por esses motivos é tão importante que os fármacos antes de serem disponibilizados no mercado passem por ensaios pré-clínicos em modelos animais.

Existem alguns modelos animais para o estudo da osteoporose em ovelhas, primatas, porcos, roedores e outros. Dentre estes, o rato é um modelo animal bem aceito e muito prático para estudos e testes terapêuticos para osteoporose. A literatura tem relatado o uso de diferentes linhagens de ratos para estes estudos, sendo as mais comuns Wistar [Richard *et al.*,1987; Jee & Yao,2001; Vasconcellos *et al.*,2005; Atmaca *et al.*, 2013; Haddad *et al.*,2015; Nazemi *et al.*,2016] e Sprague-Dawley [Gentry & Wade,1976; Farid *et al.*,2013; Chen *et al.*,2014; Wang *et al.*,2017]. Entretanto, apesar da existência dessas linhagens como modelos, as mesmas não permitem estudos com a aplicação de células de outros animais trazendo a necessidade do estabelecimento de um modelo de osteoporose em uma linhagem nude.

Diante desses fatores, este trabalho teve como objetivo a padronização de um modelo com osteoporose por ooforectomia em ratos fêmeas nude visando à

possibilidade futura de estudos terapêuticos com células-tronco humanas ou de outras espécies, e modelo de estudo para diversas doenças, como por exemplo, a análise de células tumorais humanas na osteoporose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A osteoporose é uma doença ósteo-metabólica que atinge especialmente as mulheres caracterizada por diminuição progressiva da massa óssea, com modificações na arquitetura trabecular, levando à diminuição da resistência óssea e a um maior risco de fraturas, em presença de traumas de baixa energia ou menor impacto. Está associada à insuficiência estrogênica do climatério ou às condições que induzem precocemente ao hipoestrogenismo (diminuição de estrógenos).

A prevalência da osteoporose é alta em ambos os sexos, sendo mais frequente do que a soma dos casos de infarto do miocárdio, câncer de mama e acidente vascular cerebral. Essa doença deve ser considerada como um problema de saúde pública, pois afeta o indivíduo em sua função social, física e laboral e, portanto, provoca um grande impacto socioeconômico [Haddad *et al.*,2015]. O aumento absoluto e relativo da população idosa e os hábitos pouco saudáveis das crianças e adolescentes estão levando a um grande aumento da incidência da osteoporose e também das fraturas osteoporóticas [Souza,2010].

O risco de fraturas ósseas aumenta exponencialmente com a idade e mais de 70% das fraturas afeta mulheres com mais de 65 anos. Após os 50 anos, aproximadamente uma a cada duas mulheres e um em cada cinco homens terão uma fratura osteoporótica no período restante de suas vidas [Sambrook & Cooper,2006].

O envelhecimento do tecido ósseo leva a uma perda óssea considerável de matriz extracelular e admite-se que as mulheres entre 20 e 80 anos percam de 30 a 50% da sua massa óssea [Ramalho & Castro,1999].

A fratura vertebral é a principal característica da osteoporose, caracterizada pela diminuição da massa óssea, a força e qualidade do osso e de um alto risco de fratura que pode ser consideravelmente reduzida através de tratamento. As fraturas vertebrais e de quadril levam a um aumento da morbidade e mortalidade e resultam em um enorme custo de cuidados com a saúde [Lorentzon & Cummings,2015]. Apesar da disponibilidade de um custo eficaz e de tratamentos bem tolerados para reduzir o risco de fraturas, apenas 23% das mulheres com idade igual ou maior a 67 anos com fraturas relacionadas à osteoporose realizaram um teste de densitometria

mineral óssea ou receberam prescrição para medicamentos para tratamento da osteoporose nos seis meses seguintes à fratura [Cosman *et al.*,2014].

Diferentes modelos animais vêm sendo utilizados para o estudo da osteoporose, entretanto a maioria não apresenta fraturas espontâneas, por isso é necessário a indução da osteoporose por ooforectomia (retirada dos ovários), combinada ou não com uma dieta pobre em cálcio e rica em fósforo ou por injeção de esteróides. Os primatas não-humanos e os suínos [Spencer,1979] são os únicos animais que apresentam fraturas espontâneas devido à osteoporose. Cerroni *et al.*, (2000), forneceu dados de um estudo de base populacional e transversal em macacos *rhesus*, demonstrando um padrão de maturação esquelética semelhante ao das fêmeas humanas. Este padrão inclui um declínio na densidade óssea da coluna com o avanço da idade. Nesta população de primatas não humanos, vários indivíduos idosos desenvolveram fraturas de coluna vertebral [Egermann *et al.*,2005].

2.1 FISIOPATOLOGIA DA OSTEOPOROSE

A osteoporose, chamada de "epidemia silenciosa" [Cerroni *et al.*,2000], é uma doença caracterizada pela diminuição da quantidade e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, levando à maior fragilidade óssea [Jerome *et al.*,1994], ou seja, é uma desordem do esqueleto caracterizada pela diminuição da força óssea que resulta em um aumento do risco de fratura, sendo que a força óssea é uma função tanto da densidade mineral óssea quanto da qualidade óssea [Cosman *et al.*,2014]. É uma das desordens mais importantes associadas com o envelhecimento, sendo a principal causa da morbidade, da mortalidade e da despesa médica pelo mundo [Jerome *et al.*,1994], ou seja, durante o envelhecimento normal, há uma perda de massa óssea esponjosa, conectividade óssea esponjosa e espessura cortical.

Existem duas classificações para a osteoporose de acordo com a sua causa: osteoporose primária (tipo 1) devido às causas naturais como a menopausa e senilidade, e osteoporose secundária (tipo 2), quando há uma causa primária devido

a certos medicamentos, outras doenças e sedentarismo. Contudo, quando as causas são desconhecidas é chamada de osteoporose idiopática [Souza,2010].

O metabolismo ósseo ou remodelamento ósseo é caracterizado no adulto por atividade de reabsorção coordenada e formação óssea estritamente acoplados no tempo e espaço e caracteriza histologicamente uma unidade de remodelação óssea. Esta atividade é determinada por uma fase de reabsorção da antiga matriz óssea pelos osteoclastos, seguido de uma fase de formação da matriz orgânica pelos osteoblastos (Figura 1). Os osteoclastos reabsorvem o osso, e quando a reabsorção é finalizada, segue-se um período de reversão, após o qual os osteoblastos preenchem a cavidade com matriz colágena, que é então mineralizada.

Figura 1- Representação esquemática da remodelação óssea: o ciclo de remodelação óssea é realizado pela unidade multicelular básica (BMU), que consiste em um grupo de osteoclastos e osteoblastos. O processo de remodelação óssea é iniciado pela contração das células de revestimento e pelo recrutamento de precursores de osteoclastos. Estes precursores se fundem para formar osteoclastos multinucleados ativos que medeiam a reabsorção óssea. Os osteoclastos aderem ao osso e subsequentemente removem-no por acidificação e digestão proteolítica. À medida que o BMU avança, os osteoclastos deixam o local de reabsorção e os osteoblastos se movem para cobrir a área escavada e iniciam o processo de formação de novos ossos por secreção de osteóide, que eventualmente é mineralizado em osso novo. Após a mineralização osteóide, os osteoblastos nivelam e formam uma camada de células de revestimento sobre o osso novo.

Fonte: Adaptado de Bringham et al., 2011.

Com o aumento da idade, ocorre um desacoplamento entre os processos de formação e reabsorção óssea, e a reabsorção passa a superar a formação óssea. Isso pode estar ligado a uma formação deficiente ou a uma atividade aumentada dos osteoclastos [Ramalho & Castro,1999]. Quando acontece esse desbalanceamento, ocorre uma diminuição da massa óssea devido à perda de sais minerais e cálcio, dando início à osteopenia, a qual se não for tratada terá como consequência a osteoporose.

A massa óssea de um indivíduo durante a vida é o resultado do pico de massa óssea acumulado durante a vida intra-uterina, infância e puberdade, bem como a taxa de perda óssea. Apesar de fatores genéticos contribuírem fortemente para o pico de perda óssea, fatores ambientais na vida intra-uterina, a infância e a puberdade modulam geneticamente o padrão determinado do crescimento do esqueleto [Sambrook & Cooper,2006]. Outro fator importante que pode causar a perda óssea é o início da menopausa, causando a falência ovariana e levando a uma diminuição rápida dos níveis de estrogênio, causando a chamada deficiência de estrogênio [Drake *et al.*,2015].

As diminuições das concentrações de estrogênio associado com a menopausa resultam em um aumento na reabsorção e formação óssea, sendo que a taxa de reabsorção (90%) ultrapassa a taxa de formação óssea (45%). Associado a esse aumento da reabsorção, ocorre uma perda de cálcio da reabsorção óssea para o fluido extracelular, um feito que necessita de compensação fisiológica para prevenir o desenvolvimento de hipercalemia. Mecanismos compensatórios incluem diminuição da recuperação de cálcio renal, redução da absorção do cálcio intestinal e uma redução na secreção do hormônio da paratireóide. Essas mudanças resultam em uma rede negativa do balanço de cálcio pelo corpo levando a uma desmineralização do esqueleto. Esses mecanismos compensatórios parecem resultar diretamente na redução acentuada das concentrações de estrogênio circulante, pois a reposição de estrogênio para concentrações fisiológicas resulta na preservação da reabsorção do cálcio renal e absorção do cálcio intestinal [Drake *et al.*,2015].

Com as concentrações de estrogênio diminuindo durante a menopausa, ocorre um aumento de adaptação correspondente às concentrações circulantes do hormônio folículo estimulante (FSH) devido à uma inibição do *feedback* hormonal. Esse aumento do FSH está intimamente relacionado às condições das mulheres na perimenopausa, que apresentam diminuição da densidade mineral óssea (DMO) no quadril e na espinha, e com marcadores de reabsorção óssea [Drake *et al.*,2015].

Em animais, as comparações entre os ciclos estrais são mais complexas de entender, considerando que existem múltiplos modos de ciclicidade óssea entre espécies e numerosos estímulos externos que causam variações no comprimento e/ou frequência do ciclo dentro da mesma espécie. Os animais reprodutores de dias longos, como hamsters siberianos e algumas éguas, não são reprodutivamente

ativos durante os meses do ano com luz diurna curta e entram no cio à medida que as horas de luz aumentam. Por outro lado, uma variedade de espécies de ruminantes no hemisfério norte é classificada como reprodutora em dias curtos: os ciclos estrais tornam-se cada vez mais numerosos. Concentrações de estrogênio nesses animais são elevados nos meses de inverno e outono devido ao ciclo estral e estão suprimidos durante as estações de primavera e verão. Quando a secreção de estrogênio ovariano é praticamente desprezível, prevalecem períodos de quiescência reprodutiva [Fabre-Nys & Gelez,2007].

Os ciclos estrais variam em comprimento e frequência entre diferentes espécies e envolvem diferentes posições endógenas (Apêndice 1). Geralmente, as espécies de pequeno porte passam por ciclos de cio com mais frequência, enquanto as de maior longevidade apresentam ciclos de cio regulares menos recorrentes. O ciclo estral também tende a ser mais frequente em espécies que produzem ninhadas maiores, gerando mais uma incongruência entre espécies que pode merecer alguma consideração ao selecionar modelos animais [Reinwald & Burr,2008].Turner (2001) já especulou que a sensibilidade a uma deficiência de estrogênio em um modelo animal ooforectomizado pode ser aumentada em relação à frequência de ciclos estrais.

Os mamíferos que têm ciclos ovulatórios regulares e frequentes com altos picos de estradiol são os únicos que sofrem de perda óssea por depleção de estrogênio [Kimmel,2001]. Os animais com ciclos infrequentes e baixos picos de estradiol podem desenvolver apenas um pequeno compartimento ósseo relacionado ao estrogênio e mostrar pouca perda óssea de depleção de estrogênio [Kimmel,2001]. A perda de estrogênio parece ser o mecanismo mais importante causador da osteoporose [Egermann *et al.*,2005]. Já foi relatado que em ratos, cachorros, ovelhas, suínos e primatas não-humanos ocorre uma perda óssea após a ooforectomia [Turner,2001; Vandersteenhoven & Bell,1987; Jerome *et al.*,1986].

Animais submetidos à ooforectomia ganham massa corporal devido à diminuição do estrogênio, pois a privação dos hormônios ovarianos acarreta diversos distúrbios endócrinos e funcionais, tais como disfunção sexual, perda da libido, maior risco de osteoporose e de doenças cardíacas. Desse modo a deficiência de estrogênio pode estar relacionada à diminuição de receptores de leptina no hipotálamo, o que causaria diminuição da saciedade, maior ingestão e consequente ganho da massa corpórea. Por outro lado, há também a possibilidade

de diminuição do gasto energético em fêmeas com deficiência de estrogênio o que facilitaria o ganho de massa corpórea [Ignacio *et al.*,2009].

Desde a década de 1980, sabe-se que em ratos fêmeas ooforectomizados há ganho de massa corporal. Esses animais, além do aumento de massa corporal, apresentaram também maior ingestão alimentar [Ignacio *et al.*,2009]. Atualmente, há muitos estudos sobre a relação entre hormônios femininos em modelo experimental sendo descrito um ganho na massa corporal em animais ooforectomizados [Vasconcellos *et al.*,2005].

Mulheres no período da menopausa possuem desbalanço no metabolismo ósseo, com predomínio da reabsorção óssea sobre a formação, o que leva à perda de massa óssea, sendo que o declínio na produção de estrogênio é um dos principais fatores determinantes desse desbalanço [Ignacio *et al.*,2009]. Comparadas com os homens, as mulheres têm menor acúmulo central da gordura corporal, entretanto, estudos mostraram um aumento na gordura abdominal em mulheres durante a transição para a menopausa [Ignacio *et al.*,2009].

2.2 FATORES DE RISCO DE OSTEOPOROSE

A idade é conhecida por ser o maior preditor de massa óssea em qualquer indivíduo, mulher ou homem, e a diminuição da DMO é um fator de risco significativo para a osteoporose. A densidade mineral óssea em qualquer idade nos adultos é o resultado tanto da quantidade de osso acumulado durante o crescimento quanto da taxa subsequente de *turnover* ósseo. Acredita-se que quando há o acúmulo insuficiente de tecido ósseo devido ao pico de densidade óssea atingida, a probabilidade de fraturas aumenta, ocorrendo perda óssea relacionada à idade [Riggs *et al.*,1991].

Desse modo, a obtenção de um pico de densidade óssea elevada na maturidade esquelética é considerada protetora contra a perda óssea relacionada com a idade e contra o risco de fraturas de fragilidade subsequentes [Matkovic,1992; Recker *et al.*,1992].

Nos fatores de risco para osteoporose estuda-se a possibilidade de o paciente apresentar osteoporose e a necessidade da realização de exames para comprová-

la. Há um conjunto de fatores que influenciam e favorecem o desenvolvimento da osteoporose, sendo eles: gênero feminino, etnias amarela e branca, idade avançada, precocidade do início da menopausa, hereditariedade (presença de osteoporose ou de fratura osteoporótica entre os ancestrais), história pregressa de fraturas osteoporóticas, erros nutricionais (baixa ingestão de cálcio e de vitamina D3), baixa insolação para produção da vitamina D3, situações para má absorção de alimentos, maus hábitos (ingestão exagerada de café, álcool, tabaco), sedentarismo, certas medicações (glicocorticóides, anticonvulsivantes) e doenças como a artrite reumatoide e quase todas as doenças inflamatórias sistêmicas [Souza,2010].

Por sua natureza multifatorial, seu caráter sindrômico e suas baixas manifestações clínicas, a osteoporose é difícil de diagnosticar. Muitas lombalgias e dorsalgias podem ser de origem osteoporótica e o ortopedista deve estar atento para esta possibilidade. A osteoporose também não tem sinais clínicos patognomônicos. O aumento da cifose torácica e a perda de estatura talvez sejam os sinais para maior suspeita da doença. Na maior parte das vezes a osteoporose é diagnosticada pelos ortopedistas através da fratura osteoporótica, a consequência mais deletéria [Souza,2010]

Embora no início a maioria das fraturas vertebrais seja silenciosa, essas fraturas estão associadas à alguns sintomas de dor, incapacidade, deformidade e mortalidade [Cosman *et al.*,2014].

A *National Osteoporosis Foundation* (NOF) recomenda uma abordagem abrangente para o diagnóstico e tratamento da osteoporose: uma história detalhada e exame físico, juntamente com a avaliação da DMO, uma imagem das vértebras para diagnosticar fraturas vertebrais e, se possível, estimar a probabilidade de fratura em dez anos para estabelecer os riscos individuais de fraturas dos pacientes [Cosman *et al.*,2014].

Em uma tentativa de separar pacientes com e sem osteoporose, e para definir um tratamento, múltiplos fatores foram considerados: investigação clínica dos pacientes, regulação endócrina do metabolismo e massa óssea, densidade mineral óssea, patologia e histologia da doença, características das fraturas, modelo de risco para predisposição de fraturas e o limite para o início de tratamento farmacológico [Lorentzon & Cummings,2015].

Para avaliar a DMO são comparados os valores médios da DMO das pessoas de mesma idade (*Z score*) e para isso são calculadas as porcentagens relativas e os

desvios padrões (DPs) das médias (abaixo do valor médio de um adulto jovem) [Souza,2010].

A partir desses dados, quatro categorias diagnósticas gerais foram estabelecidas (Figura 2), e os seguintes critérios são aceitos pela NOF, a *European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease* (EFFO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [Wasnich,1996]:

- 1) Normal: até -1 do DP;
- 2) Osteopenia (baixa massa óssea): de -1 a -2,5 DPs;
- 3) Osteoporose: -2,5 DPs abaixo do valor médio de um adulto jovem;
- 4) Osteoporose grave (osteoporose estabelecida): quando, além do DP < -2,5, o paciente apresenta uma fatura osteoporótica.

Se o *Z score* der valores iguais ou menores que -2 é sugestivo de uma possível osteoporose secundária. O exame deve ser repetido entre um a três anos, dependendo do critério clínico ou para controle de tratamento [Souza,2010].

Figura 2: Critérios densitométricos da Organização Mundial da Saúde (OMS).

** Osteoporose severa = -2,5 + fratura osteoporótica

Fonte: Adaptado de Miller *et al.*, 2017

O uso desta definição da OMS é questionável para modelos animais, uma vez que não há *T-score* disponível para eles. Uma diminuição significativa da DMO numa observação longitudinal pode provocar perda óssea após a cessação da função ovariana, porém não implica no desenvolvimento da osteoporose, como por exemplo, em termos de uma manifestação clínica tal como fraturas espontâneas na coluna vertebral [Egermann *et al.*,2005].

2.3 TRATAMENTOS PARA OSTEOPOROSE

A cicatrização de fraturas envolve uma cascata complexa de respostas biológicas que podem ser afetadas por fatores mecânicos, tais como a estabilidade da osteossíntese e fatores biológicos, idade e osteoporose. O tratamento da fratura em pacientes com osteoporose frequentemente apresenta complicações por falha mecânica de fixação devido à redução do estoque ósseo e propriedades mecânicas inferiores do osso [Lill *et al.*,2003].

Intervenções não farmacológicas para o tratamento da osteoporose incluem limitar o risco de quedas usando técnicas adequadas ao levantar, manter uma ingestão adequada de cálcio, vitamina D3 e proteínas, realizar atividade física de carga de peso adequada e exercícios para manter ou melhorar o equilíbrio e a postura, e outras mudanças necessárias no estilo de vida [Drake *et al.*,2015]. Os exercícios com peso e os exercícios de velocidade são os mais eficazes para o ganho de massa óssea [Souza,2010].

Nem sempre a ingestão de alimentos ricos em cálcio resulta na absorção deste pelo intestino, pois essa absorção depende de o cálcio estar sob a forma de sais absorvíveis. A administração isolada de cálcio é eficiente para diminuir a incidência de fraturas [Souza,2010].

Nas últimas duas décadas surgiram diversos agentes farmacológicos efetivos e seguros para uso em terapias preventivas de osteoporose ou para o remodelamento ósseo para a inibição da reabsorção óssea (drogas antirreabsortivas ou anti-ativação) ou visando o aumento da formação óssea (drogas anabólicas).

Os fármacos antirreabsortivos pertencem ao grupo dos bisfosfatos que são os agentes mais usados nos tratamentos, pois mostraram uma redução de 70% para fraturas espinhais, 40-50% para fraturas de quadril e 20-25% para fraturas não vertebrais. Dentre as drogas anabólicas, a única atualmente disponível para o tratamento da osteoporose é o hormônio recombinante da paratireóide (PTH), permitindo uma redução das fraturas espinhais em 65% e fraturas não vertebrais em 53%[Eriksen *et al.*,2012].

Apesar dos avanços da farmacoterapia, a maioria dos pacientes com osteoporose não é tratada e, entre aqueles que iniciam a terapia, a adesão à terapia é baixa cerca de 50% até os dois primeiros anos[Eriksen *et al.*,2012].

As atuais opções farmacológicas aprovadas pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) para a prevenção e/ou tratamento de osteoporose pós-menopausa incluem: ativador do receptor do fator nuclear KB ligante (denosumab), bisfosfonatos, calcitonina, estrogênio (ou terapia hormonal), agonista/antagonista de estrogênio, hormônio da PTH e teriparatida e moduladores seletivos de receptores de estrogênios (SERMs) [Cosman *et al.*,2014]. Entretanto, várias dessas substâncias apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Os bisfosfanatos são os mais usados pelos profissionais de saúde, pois apresentam os menores efeitos colaterais para o tratamento desta patologia [Neto *et al.*,2010].

Tratamentos alternativos aos convencionais têm utilizado fatores de crescimento ósseo, visto que o desenvolvimento, reparo e manutenção do esqueleto é dependente das ações de uma variedade de fatores solúveis de crescimento [Piche & Graves,1989; Centrella *et al.*,1989; Canalis *et al.*,1989; Hock & Canalis,1994] e, também das células-tronco mesenquimais (MSC).

As citocinas expressas durante a formação óssea pelas fraturas ou por outros hormônios anabólicos (PTH, hormônios de crescimento-GH) são potenciais agentes terapêuticos para o estímulo do crescimento ósseo e reparação óssea. Estes incluem: fatores de crescimento de insulina 1 (IGF-1), fatores de crescimento transformante β (TGF- β), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) [Rubin & Bilizekin,2002].

A terapia com células-tronco para a osteoporose poderia potencialmente reduzir a susceptibilidade de fraturas e contribuir para o aumento da densidade mineral perdida, elevando o número ou restaurando a função das células-tronco que podem proliferar e se diferenciar em células formadoras de osso [Anteb *et al.*,2014; Liu *et al.*,2012].

Com o envelhecimento, o número de MSC diminui levando a uma redução significativa na formação óssea contribuindo para a osteoporose [Chen *et al.*,2002; Katsara *et al.*,2011; Bonyadi *et al.*,2003; Brack & Rando,2007; Muschler *et al.*,2001; Wang *et al.*,2006]. Na literatura é descrito o papel imunossupressor das MSC às quais são consideradas seguras para o uso clínico pelo FDA [Trounson *et al.*,2011]. Alguns trabalhos realizaram transplantes de MSCs, de forma local ou sistêmica, em modelos animais osteoporóticos submetidos à ooforectomia ou à agentes

glucocorticóides [Anteb *et al.*,2014]. Células-tronco mesenquimais injetadas no fêmur de ratos [Ocarino *et al.*,2010] e coelhos [Wang *et al.*,2006] ooforectomizados mostraram um aumento do osso trabecular e da espessura das trabéculas, assim como rigidez óssea, a partir de oito semanas. Atualmente, as MSCs são as células-tronco mais amplamente utilizadas na pesquisa do tratamento da osteoporose devido à sua capacidade intrínseca de se diferenciar em osteoblastos, sua facilidade de aquisição e capacidade de manipulação genética para aplicações *in vivo* [Anteb *et al.*,2014].

2.4 MODELO ANIMAL PARA OSTEOPOROSE

Como dito anteriormente, com exceção dos primatas não-humanos que apresentam fraturas espontâneas, na maioria dos animais usados como modelo para o tratamento da osteoporose é necessário a indução da doença através da ooforectomia, dieta pobre em cálcio e rica em fósforo ou através de injeção de esteróides.

A ooforectomia é um dos métodos mais amplamente utilizados para a indução da osteoporose em modelos animais. Com a obtenção desses modelos é possível investigar a condição osteoporótica a fim de facilitar o teste pré-clínico de agentes farmacêuticos e avaliar as opções de tratamento [Zarrinkalam *et al.*,2009].

Kalu (1991) definiu um modelo animal para osteoporose como um animal vivo no qual uma diminuição espontânea ou induzida na DMO devido à perda da função ovariana pode ser estudada. Nos modelos animais de osteoporose experimental, os animais devem apresentar alterações na massa óssea e no metabolismo ósseo e alterações na estrutura óssea e na resistência mecânica [Nagai & Shindo,1997]. Caso o foco do estudo seja a Medicina Humana, este modelo deve ser comparável à osteoporose humana com relação ao grau de osteoporose, deterioração da estrutura óssea, redução da competência mecânica do osso e alterações na histomorfometria, metabolismo ósseo, perfil hormonal e anatomia [Lill *et al.*,2003]. A fim de satisfazer estes critérios, muitas espécies de grande porte incluindo cães, gatos, minipigs, ovelhas e primatas não humanos têm sido utilizados [Zarrinkalam *et al.*,2009]. Os modelos animais mais reconhecidos na literatura para o tratamento de osteoporose

são: ratos (pequeno porte), beagles, minipigs, ovelhas, primatas não-humanos (grande porte), porém existem novos modelos sendo estudados (porquinho da índia, cabra, etc) (Apêndice 2).

O FDA exige que após os testes com resultados positivos no tratamento da osteoporose em camundongos e/ou ratos, um modelo animal de porte grande que mais se assemelhe com a doença das mulheres com osteoporose seja utilizado. Para isso, os requisitos mais importantes para um modelo animal de porte grande para osteoporose são: que o animal tenha remodelação óssea intracortical, que o animal tenha resposta osteopênica à manipulação mecânica, hormonal ou nutricional (imobilização, envelhecimento, ooforectomia, lactação, restrição de cálcio) e que o modelo possa ser padronizado [Mosekilde,1995].

É importante lembrar que, a rede esponjosa dos animais é muito densa tanto nos corpos vertebrais quanto no colo do fêmur em comparação com a rede dos seres humanos, sendo difícil induzir perfurações osteoclásticas nessa rede. Desse modo é difícil criar a perda desproporcionada de resistência óssea (característica para seres humanos) em muitos dos grandes modelos animais [Mosekilde,1995]. Além disso, na maioria dos animais grandes, há nos corpos vertebrais uma concha cortical distinta com sistemas de Havers, com a espessura de 1.500-3.000 μm [Mosekilde *et al.*,1993b]. Nos corpos vertebrais humanos, não há uma concha cortical - apenas um condensado de trabéculas ósseas. A espessura da "concha cortical" é de 200-400 μm [Mosekilde,1993c].

Existem prós e contras associados com as condições esqueléticas, hormonais e metabólicas de cada espécie que influenciam a sua relevância e aplicabilidade à fisiologia humana (Apêndice 2) [Reinwald & Burr,2008]. A conveniência para modelos animais é determinada de acordo com o custo, disponibilidade, requisitos de manutenção, dificuldades de manuseio e a necessidade de projetar/ implementar/ validar novos procedimentos de análise [Kimmel,2001].

Não existe um único modelo animal que mimetize com precisão a osteoporose humana. A ooforectomia isoladamente parece ser adequada para reduzir as propriedades mecânicas, mas não reduz a densidade mineral óssea a níveis comparáveis aos observados em humanos. Modelos usando esteróides combinados com ooforectomia mostraram uma perda óssea mais elevada [Egermann *et al.*,2005]. No entanto, cada modelo tem suas próprias vantagens particulares, e sua seleção deve, portanto, ser baseada na questão científica

abordada. Em relação à microestrutura do osso esponjoso, modelos envolvendo animais grandes como ovelhas ou cães parecem ser superiores aos que envolvem pequenos animais, uma vez que a espessura e separação trabecular murina é aproximadamente três vezes menor do que em seres humanos [Egermann *et al.*,2005].

É recomendado que os estudos de tratamento em ratos com osteoporose tenham uma duração de cerca de 12 meses e em outras espécies sejam de 16 meses, equivalendo a quatro anos de tratamento humano [Kimmel,2001]. As diretrizes também sugerem a medição não apenas da densidade mineral óssea e dos marcadores bioquímicos do *turnover* ósseo, mas também da resistência óssea através de testes biomecânicos, como substitutos para a propensão para desenvolver fraturas por fragilidade [Kimmel,2001]. A avaliação pré-clínica também é necessária para determinar novas opções de tratamentos medicamentosos e cirúrgicos e, portanto, há a necessidade de modelos animais de pequeno e grande porte para o estudo da osteoporose [Egermann *et al.*,2005].

O rato como estudo para o tratamento da osteoporose já é aceito, e, por ser de pequeno porte e baixo custo, permite a condução de estudos sob condições bem padronizadas. Além disso, a anatomia do esqueleto de rato tem muitas semelhanças com o esqueleto humano: ratos possuem remodelamento ósseo esponjoso com locais de remodelação muito semelhantes aos observados no osso esponjoso humano e possuem osso lamelar. A cirurgia de ooforectomia em ratos permite produzir alterações na rede esponjosa idênticas às observadas no esqueleto humano durante o envelhecimento e na menopausa, porém podem apresentar algumas desvantagens [Mosekilde,1995], como por exemplo, exibem baixos níveis de remodelação Havers [Turner, 2001].

Na literatura há muitos estudos de ooforectomia em linhagens de ratos. Ratos fêmeas Sprague-Dawley têm sido utilizadas desde a década de 40 como modelo animal para a indução da osteoporose por ooforectomia. Diversos estudos têm mostrado o uso dessa linhagem para observar a importância do estrogênio na regulação da atividade física [Gentry & Wade,1976] ou para tratamentos da osteoporose usando bisfosfonatos, como por exemplo, o alendronato [Chen *et al.*,2014].

Outros estudos utilizaram a linhagem de ratos Wistar como modelo animal para a osteoporose para o tratamento da doença utilizando novos fármacos [Haddad

et al.,2015], interações entre exercícios físicos e hormônios ovarianos [Richard *et al.*,1987] ou em estudos que avaliaram a resistência óssea [Nazemi *et al.*,2016].

Entretanto, nenhuma das linhagens citadas anteriormente podem ser utilizadas no estudo do tratamento da osteoporose com injeção de células-tronco ou células tumorais de outras espécies. Para algumas propostas é possível o uso de camundongos nudes com osteoporose. Porém para alguns ensaios o ideal seria o uso de uma linhagem de rato nude. Na literatura existe apenas um trabalho utilizando uma linhagem de ratos nudes em um modelo de osteopenia [Sass *et al.*,1997] para análise do envolvimento de linfócitos T na patogênese da osteoporose com deficiência de estrogênio.

Frente a esta lacuna, neste trabalho foi proposto desenvolver um modelo de osteoporose em ratos fêmeas nude Rowett, uma linhagem heterogênica imunodeficiente (mutante espontâneo) que não apresenta uma população do linfócito T, para futuros testes terapêuticos com células de diferentes espécies.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo animal para osteoporose em rato fêmea nude (Rowett) induzido por ooforectomia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um modelo de osteoporose induzida por ooforectomia utilizando a linhagem de ratos fêmeas Sprague-Dawley;
- Padronizar um modelo de osteoporose induzida por ooforectomia utilizando a linhagem de ratos fêmeas nude Rowett (NTacFcfiq: NIH-Whn);
- Analisar a densitometria mineral óssea dos ossos fêmures dos animais induzidos à osteoporose;
- Realizar as análises histológicas dos ossos fêmures coletados dos animais induzidos à osteoporose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para os ensaios de osteoporose induzida foi estabelecido o modelo em ratos fêmeas utilizando as linhagens de Sprague-Dawley e nude Rowett. Foram utilizados 30 ratos fêmeas de cada linhagem com 12 semanas de idade com cerca de 180 gramas para ratos fêmeas Sprague-Dawley e 130g para ratos fêmeas nude Rowett. Os animais foram mantidos em condições constantes de temperatura (20 ± 1 °C) e luz (12 horas- ciclo claro/escuro) com acesso *ad libitum* à ração peletizada e água. Foram realizados dois experimentos independentes para cada linhagem. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Este trabalho, número 4918200715, foi aprovado pela Comissão e Ética no Uso de Animais- CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A primeira linhagem de ratos utilizada para a padronização do experimento de osteoporose induzida por ooforectomia foi a linhagem Sprague-Dawley (NTca: SD-FCFIQ/USP: SD), sendo um modelo heterogênico (*outbred*) tendo o estoque original sido estabelecido por Robert Worthington Dawley em 1925, adquirido pelo laboratório Charles River em 1996, e pelo Biotério da FCFIQ/USP em 2001 através da Taconic, Germantown, USA [Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Charles River Laboratories]. Os ratos Sprague-Dawley possuem cor albina e olhos vermelhos pesando em média 55-60g na época do desmame (21 dias de idade), 340g (macho) e 180g (fêmeas) quando jovens adultos em torno de 8 semanas e quando adulto (10 semanas) pesando cerca de 500g (macho) e 280g fêmeas [Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Charles River Laboratories].

A segunda linhagem de ratos utilizada para a padronização do experimento de osteoporose induzida por ooforectomia, alvo deste trabalho, foi a linhagem de

rowett NIH (FCFIQ/USP: SD), sendo um modelo heterogênico (*outbred*) imunodeficiente (mutante espontâneo), também conhecido como Rato Nude. Em consonância com as regras de nomenclatura ILAR, o laboratório Taconic recentemente atualizou a nomenclatura para NIHRNU da NTac: NIH-Whn para NTac: NIH-Foxn1^{nu}. Essa linhagem foi desenvolvida pelo *National Institute of Health* (NIH) em 1979-1980 através de vários acasalamentos em que foi adicionado o gene nude Rowett e retrocruzadas em oito espécies, sendo produzido pelo laboratório Charles River em 2001 e adquirida pelo Biotério da FCFIQ/USP em 2001 através da Taconic, Germantown, USA [Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Charles River Laboratories]. O rato nude homozigoto atímico possui deficiência da célula T e mostra populações de células empobrecido nas áreas dependentes do timo de órgãos linfóides periféricos. Apesar de carecer de células T, o rato nude tem um complemento normal de células B óssea dependente da medula. Os ratos nudes heterozigotos não apresentam deficiência da célula T. Essa linhagem pode ser de cor albina com olhos vermelhos, preta ou preta e branca, sendo que alguns animais podem exibir períodos intermitentes de crescimento ou queda de pelos, pesam em média 45-50g na época do desmame (28 dias de idade), 230g (macho) e 140g (fêmeas) quando jovens adultos em torno de 8 semanas e quando adultos (10 semanas) pesam cerca de 300g (macho) e 180g fêmeas, sendo que esses animais tem uma média de vida útil de cerca de nove meses [Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Charles River Laboratories].

4.2 ENSAIO DE OSTEOPOROSE POR OOFORECTOMIA EM RATOS FÊMEAS SPRAGUE-DAWLEY E NUDE ROWETT

Foi realizada uma ooforectomia baseada na literatura (Lasota & Danowska-Klonowska, 2004; Khajuria *et al.*, 2012). Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley e da linhagem nude Rowett para a padronização do procedimento. Os ratos fêmeas foram divididas em três grupos (controle, sham e ooforectomia) com cinco animais cada. Os animais foram anestesiados por via inalatória com 2% isoflurano em oxigênio.

A cirurgia foi realizada em um fluxo laminar horizontal (Veco CFLH-18). Os pelos presentes na área da cirurgia foram retirados e a área foi desinfetada com etanol 70% e iodopolvidine. Foram estabelecidos três grupos: grupo controle (animais não submetidos à cirurgia), grupo sham (animais que tiveram a gordura ao redor do útero removida) e grupo ooforectomia (animais submetidos à cirurgia para retirada dos ovários). Foi feita uma incisão transversal de 0.4 a 0.6 cm no meio do abdômen, ligeiramente para a direita, perto do mamilo direito do rato, com uma lâmina de bisturi cirúrgico. O músculo transversal abdominal foi exposto depois da incisão na pele e, após o músculo ser dissecado, o espaço peritoneal e o tecido adiposo em torno dos ovários ficaram expostos. Após acessar a cavidade peritoneal, o tecido adiposo foi retirado até que o tubo uterino direito e o ovário direito cercados pela gordura foram identificados. O ovário juntamente com a gordura foi facilmente localizado e exteriorizado por uma retração suave. O procedimento foi repetido no ovário esquerdo com a mesma incisão. Foi feita uma ligadura no útero a fim de remover completamente os ovários, um de cada vez e o útero foi recolocado na cavidade peritoneal após a retirada dos ovários. A incisão foi fechada com duas camadas (músculo e pele) usando suturas estéreis. O peritônio e as camadas musculares foram suturadas com uma sutura absorvível e a pele foi suturada com uma sutura não absorvível. Foi aplicado iodopolvidine na área para a pele ser desinfetada após a cirurgia. Alto grau de procedimento asséptico foi mantido durante a cirurgia.

Semanalmente os ratos foram pesados para avaliação da massa corporal e também foi coletado sangue pela veia caudal para análise de marcadores hormonais, como por exemplo o 17 β -Estradiol e para avaliação da glicemia a fim de inferir se os animais com osteoporose induzida desenvolveram alteração glicêmica. Nos dias 0, 21, 45 e 60 do procedimento da cirurgia, foi realizado uma densitometria óssea para avaliação da osteoporose. Os animais foram eutanasiados no 60º após a cirurgia de indução de osteoporose e os ossos fêmures esquerdo e direito foram coletados e mantido em 10% paraformaldeído (PFA) para posterior análises histológicas.

4.3 ANÁLISE DE DENSITOMETRIA MINERAL ÓSSEA

Para realizar a análise da DMO dos animais, foi utilizado o aparelho In-Vivo Imaging System FX PRO (Carestream Molecular Imaging) (CEFAP- ICB/USP) através de geração de imagens provenientes de raio-x.

Foi analisada uma região de interesse denominada ROI abaixo da cabeça do osso fêmur. A largura e altura do ROI foram padronizados em 59 e 65 mm, respectivamente. Decidimos utilizar o conteúdo mineral ósseo (g/cm^2) e o conteúdo do volume ósseo (g/cm^3) para derivar a DMO.

4.4 COLETA DE SANGUE E SORO

Nos dias 0, 21, 45 e 60 do procedimento de osteoporose, foram coletados cerca de 1mL de sangue dos animais para posterior análise do hormônio 17β -estradiol. Após meia hora da coleta, o sangue foi centrifugado a 2.500 rpm por dez minutos à 4 °C (Eppendorf centrifuge-5810R). O soro foi separado do sangue e coletado cerca de 500 μL . Foram mantidos no freezer -80 °C para posterior análises de marcadores hormonais.

4.5 DOSAGEM DE 17β -ESTRADIOL

A análise de 17β -estradiol foi realizada a partir da precipitação das amostras em éter de petróleo para análise do nível hormonal de estradiol nos ratos submetidos e não submetidos à ooforectomia.

Foram pipetados 200 μL de soro das amostras em um tubo de vidro e, em seguida foi adicionado 2 mL de Éter de Petróleo (Fisber E120-4). As amostras foram deixadas no agitador tipo vortex de 30-45 segundos. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho de gelo seco e metanol por 10 minutos. Após esse tempo, a camada de soro congelou e o éter de petróleo foi vertido em tubo de vidro. Em

seguida os tubos foram colocados no liofilizador (Labconco®) por 1 hora, para que o líquido evaporasse e depois foi realizado a dosagem desse hormônio utilizando um teste de ELISA com um anticorpo para 17 β -estradiol.

Esse teste foi baseado no protocolo do Dr. Ricardo Pereira do VRA/FMVZ-USP tendo sido modificado, pois as amostras encontravam-se pouco concentradas e por isso foi realizado a precipitação das amostras para concentração das mesmas.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os ossos fêmures foram coletados e fixados em 10% PFA e foram encaminhados para a Histotech para o procedimento de descalcificação, inclusão em parafina, cortes histológicos e colorações de Tricômio de Masson e Hematoxilina & Eosina. As imagens geradas foram registradas no Microscópio de Luz com Fluorescência (FLM) Nikon Eclipse 80i.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 6.0, Software Inc, USA. Foi realizado o teste ANOVA e diferenças estatísticas foram consideradas quando o $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

O projeto foi desenvolvido em duas etapas: (i) padronização do modelo de osteoporose em Sprague-Dawley, (ii) padronização do modelo de osteoporose em nude Rowett.

5.1 MODELO DE OSTEOPOROSE EM RATOS FÊMEAS SPRAGUE-DAWLEY E NUDE ROWETT

5.1.1 Procedimento de ooforectomia

Para a padronização do modelo de osteoporose induzida por ooforectomia foi escolhida a linhagem Sprague-Dawley com 12 semanas (Figura 3) amplamente utilizada na literatura neste modelo de estudo.

Diferentes formas de cirurgia foram analisadas [Lasota & Danowska-Klonowska,2004; Khajuria *et al.*,2012] para a escolha do melhor procedimento a ser realizado.

Durante 60 dias após o procedimento cirúrgico os animais foram acompanhados semanalmente para coleta dos dados.

Figura 3 – Padronização do procedimento de ooforectomia na linhagem Sprague-Dawley. (A) Área desinfetada para cirurgia, (B) Incisão de 1 cm, (C) retirada do útero e ovário esquerdo, (D) úteros e ovários após retirada do excesso de gordura, (E) útero e ovário expostos, (F) retirada dos ovários com fio de nylon (G), sutura pele com fio de sutura não absorvível.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

A linhagem Sprague-Dawley foi escolhida como modelo de padronização de osteoporose no NUCEL, pois são animais robustos e, como o procedimento de ooforectomia nunca havia sido realizado, era necessário garantir sua funcionalidade. Além disto este modelo será utilizado para outros projetos de regeneração óssea no âmbito da Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC) do qual o NUCEL faz parte como um Centro de Tecnologia Celular (CTC).

Tendo sido padronizado o modelo de osteoporose induzida por ooforectomia em Sprague-Dawley, foi iniciada a padronização do modelo alvo do estudo, ratos fêmeas da linhagem nude Rowett. Foi realizado o procedimento de osteoporose induzida por ooforectomia (Figura 4). Os animais foram pesados semanalmente até o dia da coleta e tiveram o sangue coletado nos dias 0, 21, 45 e 60 após o procedimento de ooforectomia.

Figura 4– Procedimento de ooforectomia na linhagem nude Rowett. (A) Incisão de até 1 cm, (B) retirada dos úteros e ovários para remoção do excesso de gordura, (C) remoção do ovário, (D) úteros suturados com fio de nylon, (E) musculatura interna suturada com fio de nylon absorvível, (F) pele suturada com fio de nylon não absorvível.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

5.1.2 Análise da massa corporal

No decorrer das semanas foi observado um aumento de massa corporal (Gráfico 1- Sprague-Dawley e 2- nude Rowett) no 21º dia após a cirurgia, sendo que no dia da coleta o peso já estava quase o dobro quando comparado ao dia 0.

Para cada linhagem foram realizados dois experimentos independentes, porém que foram analisados em conjunto. Observando o gráfico (1) é possível verificar que o peso nos animais induzidos à osteoporose aumentou gradativamente a partir da segunda semana após a cirurgia, em comparação aos grupos controle e sham. Essa variação se manteve até o dia da coleta final (60 dias)

Nos animais da linhagem Sprague-Dawley (Gráfico 1) foi possível observar diferenças significativas aos 21, 45 e 60 dias após a cirurgia de ooforectomia entre os grupos controle vs ooforectomia ($p < 0,0001$) e sham vs ooforectomia ($p < 0,0001$). No dia 0 não houve diferenças significativas entre os grupos e também não houve diferenças entre os grupos controle vs sham dos dias 21, 45 e 60.

Gráfico 1- Variação da massa corporal dos ratos fêmeas Sprague-Dawley submetidos aos procedimentos de ooforectomia.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Nos animais da linhagem nude Rowett (Gráfico 2) foi possível observar diferenças significativas entre os grupos controle vs ooforectomia nos dias 0 ($p < 0,01$), 21, 45 e 60 ($p < 0,0001$) após a cirurgia, entre os grupos sham vs ooforectomia nos dias 0 ($p < 0,01$), 21, 45 e 60 ($p < 0,0001$) e entre o grupo controle vs sham ($p < 0,001$) no dia 60.

Gráfico 2- Variação da massa corporal dos ratos fêmeas da linhagem nude Rowett submetidas aos procedimentos de ooforectomia.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Nos ratos Sprague-Dawley, visualmente é possível observar o aumento de peso entre os animais do grupo controle e aqueles submetidos à ooforectomia (Figura 5). Nos animais ooforectomizados, a região do abdômen apresentou-se mais volumosa.

Figura 5– Ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley com 60 dias após o procedimento de ooforectomia. (A) Controle, (B) sham e (C) ooforectomizado.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

5.1.3 Análise da densidade mineral óssea (DMO)

Para confirmar se os animais desenvolveram osteoporose, foi realizado uma avaliação não invasiva com baixa emissão de raio-x, denominada densitometria mineral óssea, nos dias 0, 21º, 45º e 60º após a cirurgia para avaliar a diminuição da DMO (Figura 6). Para este procedimento os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina, conforme recomendado no manual Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) [Seabra *et al.*, 2016] para que não se movessem durante o procedimento.

Figura 6– Raio x dos ratos fêmeas submetidas à análise de densitometria óssea: (A) ratos Sprague-Dawley: (A1) controle, (A2) sham, (A3) ooforectomizado; (B) ratos nude Rowett- (B1) controles, (B2) sham e (B3) ooforectomizado.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

5.1.3.1 Conteúdo do volume ósseo (g/cm^3)

Nos dois experimentos realizados com os ratos Sprague-Dawley foi observado uma diminuição do conteúdo do volume ósseo (Quadro 1) do grupo ooforectomizado em relação aos grupos controle e sham, principalmente no dia 60 após a ooforectomia.

Quadro 1– Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (A1) fêmur esquerdo, (A2) fêmur direito e (A3) ambos os fêmures.

A1	DMO (g/cm ³)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	1,77 (n=4)	1,52 (n=2)	1,76 (n=2)	1,87 (n=10)
	Sham		1,81 (n=2)	1,74 (n=2)	1,72 (n=10)
	Ooforectomia		1,74 (n=2)	1,77 (n=2)	1,72 (n=10)
A2	DMO (g/cm ³)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	1,53 (n=4)	1,86 (n=2)	1,72 (n=2)	1,81 (n=10)
	Sham		1,86 (n=2)	1,64 (n=2)	1,80 (n=10)
	Ooforectomia		1,69 (n=2)	1,53 (n=2)	1,71 (n=10)
A3	DMO (g/cm ³)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	1,65 (n=8)	1,69 (n=4)	1,74 (n=4)	1,83 (n=20)
	Sham		1,83 (n=4)	1,69 (n=4)	1,76 (n=20)
	Ooforectomia		1,71 (n=4)	1,65 (n=4)	1,62 (n=20)

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

No gráfico 3 podemos observar que o grupo ooforectomia para Sprague-Dawley apresentou uma tendência à diminuição em relação aos outros grupos, porém sem diferenças significativas entre os grupos analisados.

Gráfico 3– Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (A1) fêmur esquerdo, (A2) fêmur direito e (A3) ambos os fêmures.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Nos experimentos realizados com os ratos nude Rowett, 60 dias após o procedimento de ooforectomia foi observado uma tendência à diminuição do conteúdo do volume ósseo (Quadro 2) do grupo ooforectomizado em relação aos grupos controle e sham, contudo nos grupos fêmur direito (B) e fêmur esquerdo + direito (C), os valores do grupo sham foram maiores que o do grupo controle. Também observamos que no dia 60 dos grupos com o fêmur esquerdo (A), B e C o grupo controle apresentou valor menor em relação ao dia 0.

Quadro 2—Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (B1) fêmur esquerdo, (B2) fêmur direito e (B3) ambos os fêmures.

B1	DMO (g/cm ³)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	2,38 (n=4)	1,97 (n=2)	1,51 (n=2)	2,01 (n=9)
	Sham		1,97 (n=2)	1,84 (n=2)	1,99 (n=10)
	Ooforectomia		1,78 (n=2)	1,70 (n=2)	1,76 (n=10)
B2	DMO (g/cm ³)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	2,46 (n=4)	1,79 (n=2)	1,78 (n=2)	1,93 (n=9)
	Sham		1,77 (n=2)	1,84 (n=2)	2,04 (n=10)
	Ooforectomia		1,94 (n=2)	1,83 (n=2)	1,76 (n=10)
B3	DMO (g/cm ³)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	2,42 (n=8)	1,88 (n=4)	1,64 (n=4)	1,97 (n=18)
	Sham		1,87 (n=4)	1,84 (n=4)	2,01 (n=20)
	Ooforectomia		1,86 (n=4)	1,76 (n=4)	1,76 (n=20)

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Gráfico 4– Média da DMO (g/cm^3) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (A) fêmur esquerdo, (B) fêmur direito e (C) ambos os fêmures.

a= Controle vs Ooforectomia ($p < 0,01$)

b,c= Sham vs Ooforectomia ($p < 0,01$)

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

No gráfico 4, no fêmur esquerdo (A), foi observada diferença estatística entre o grupo Controle vs Ooforectomia e Sham vs Ooforectomia ($p > 0,01$). Para o fêmur

direito (B) houve diferença somente no grupo Sham vs Ooforectomia ($p>0,01$). Na análise dos dois fêmures juntos (C) não foi observada diferença significativa, pois há um grande desvio na medida dos fêmures do grupo controle. Entretanto, é possível observar que há uma tendência à diminuição na DMO.

5.1.3.2 Conteúdo mineral ósseo (g/cm^2)

Nos experimentos realizados com ratos fêmeas Sprague-Dawley foi observado uma diminuição do conteúdo mineral ósseo (Quadro 3- Gráfico 5) do grupo ooforectomizado em relação aos grupos controle e sham. Contudo o grupo sham ainda apresentou valores maiores que o grupo controle quando medido somente o fêmur esquerdo. Em relação às medidas do fêmur direito, o grupo sham apresentou um valor menor que o do grupo controle e, quando ambos os fêmures foram analisados, os valores permaneceram iguais nos dias 45 e 60 após a cirurgia de ooforectomia.

Quadro 3– Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (A1) fêmur esquerdo, (A2) fêmur direito e (A3) ambos os fêmures.

A1	DMO (g/cm ²)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	0,36 (n=4)	0,34 (n=2)	0,37 (n=2)	0,37 (n=10)
	Sham		0,37 (n=2)	0,38 (n=2)	0,39 (n=10)
	Ooforectomia		0,35 (n=2)	0,35 (n=2)	0,35 (n=10)
A2	DMO (g/cm ²)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	0,33 (n=4)	0,37 (n=2)	0,37 (n=2)	0,38 (n=10)
	Sham		0,35 (n=2)	0,36 (n=2)	0,37 (n=10)
	Ooforectomia		0,36 (n=2)	0,37 (n=2)	0,36 (n=10)
A3	DMO (g/cm ²)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	0,34 (n=8)	0,35 (n=4)	0,37 (n=4)	0,38 (n=20)
	Sham		0,36 (n=4)	0,37 (n=4)	0,38 (n=20)
	Ooforectomia		0,35 (n=4)	0,36 (n=4)	0,36 (n=20)

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Gráfico 5– Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (A1) fêmur esquerdo, (A2) fêmur direito e (A3) ambos os fêmures.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Nos experimentos realizados com os ratos nude Rowett foi possível observar que no dia 60 após a cirurgia de ooforectomia, o grupo ooforectomizado apresentou o mesmo valor que o grupo controle (Quadro 4, Gráfico 6). Semelhante ao

observado para os animais Sprague-Dawley, os valores do grupo controle no dia 60 foram menores em relação ao dia 0. Outro dado observado é que no dia 60 os valores dos grupos controle, sham e ooforectomia estavam maiores em relação aos dias 21 e 45. Entretanto, não houve diferenças estatísticas referentes ao conteúdo mineral ósseo (g/cm^2).

Quadro 4—Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (B1) fêmur esquerdo, (B2) fêmur direito e (B3) ambos os fêmures.

B1	DMO (g/cm ²)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	0,40 (n=4)	0,34 (n=2)	0,35 (n=2)	0,36 (n=9)
	Sham		0,35 (n=2)	0,33 (n=2)	0,36 (n=10)
	Ooforectomia		0,34 (n=2)	0,30 (n=2)	0,36 (n=10)
B2	DMO (g/cm ²)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	0,39 (n=4)	0,36 (n=2)	0,35 (n=2)	0,35 (n=9)
	Sham		0,34 (n=2)	0,34 (n=2)	0,36 (n=10)
	Ooforectomia		0,35 (n=2)	0,35 (n=2)	0,35 (n=10)
B3	DMO (g/cm ²)				
	Grupo	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 60
	Controle	0,39 (n=8)	0,25 (n=4)	0,35 (n=4)	0,35 (n=18)
	Sham		0,34 (n=4)	0,33 (n=4)	0,36 (n=20)
	Ooforectomia		0,34 (n=4)	0,32 (n=4)	0,35 (n=20)

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Gráfico 6– Média da DMO (g/cm^2) para os ratos fêmeas da linhagem nude Rowett dos grupos submetidos ou não à ooforectomia: (B1) fêmur esquerdo, (B2) fêmur direito e (B3) ambos os fêmures.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

5.1.4 Análise da glicemia

A glicemia de ambas as linhagens foi medida nos dias 0, 21, 45 e 60 após o procedimento de ooforectomia, porém não houve diferenças significativas entre elas, indicando que não é uma variável interferente no processo. A média do valor da glicemia para os ratos fêmeas Sprague-Dawley e nude Rowett foi de 150 mg/dL.

5.1.5 Análise de estradiol

Foi realizado o teste com um kit para 17β -estradiol para análise do nível hormonal nos dias 0 e 60 após a cirurgia de ooforectomia. Esperava-se que com 60 dias o grupo ooforectomizado apresentasse um nível de estradiol menor que o grupo controle, porém os dados obtidos nas medidas foram heterogêneos e, por isso, considerados inconclusivos.

5.1.6 Análise histológica dos ossos fêmures

Foi realizada uma análise histológica qualitativa dos ossos fêmures nos grupos experimentais do dia 0 e 60 após a cirurgia de ooforectomia.

Nos grupos ooforectomizados dos ratos fêmeas Sprague-Dawley (Figura 7) foi possível observar osso trabecular mais fino, trabéculas menores, amplos espaços vazios e mais tecido medular com um aumento da sua área, em comparação com os grupos controle e sham no período experimental de 60 dias.

Figura 7- Histologia do osso fêmur em ratos fêmeas Sprague-Dawley não submetidas e submetidas à indução de osteoporose 60 dias após o início do experimento. Corada com hematoxilina e eosina. Osso cortical (*); Osso trabecular (OT); Medula óssea (MO). (A1) Controle, (A2) sham, (A3) ooforectomizado (C).

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

Conforme observado para os ratos fêmeas Sprague-Dawley ooforectomizadas, os animais nude Rowett (Figura 8) submetidos à cirurgia também apresentaram trabéculas mais finas, osso trabecular mais fino, e mais tecido medular em comparação com os grupos controle e sham no período experimental de 60 dias.

Figura 8- Histologia do osso fêmur em ratos fêmeas nude Rowett não submetidas e submetidas à indução de osteoporose 60 dias após o início do experimento. Corada com hematoxilina e eosina. Osso cortical (*); Osso trabecular (OT); Medula óssea (MO). (B1) Controle, (B2) sham e (B3) ooforectomizado.

Fonte: (AZZI, C.M.G., 2017).

6 DISCUSSÃO

A osteoporose é um problema de saúde pública grave e com o envelhecimento da população são necessários modelos de estudos práticos e de baixo custo para testes terapêuticos.

Um modelo animal é indispensável para a demonstração do benefício de qualquer nova modalidade terapêutica que difira suficientemente do tratamento padrão. Além disso, testes pré-clínicos de novos tratamentos ou dispositivos são necessários para provar a eficiência e segurança. Em suas diretrizes para avaliação pré-clínica e clínica de agentes utilizados no tratamento ou na prevenção da osteoporose pós-menopausa, o FDA recomenda que os agentes sejam avaliados em duas espécies animais diferentes, incluindo ratos ooforectomizados e um segundo modelo animal grande que possua sistemas de Havers e padrões de remodelação semelhante à situação humana [Egermann *et al.*, 2005], sendo recomendado que os animais ou percam massa óssea ou se tornem osteopênicos após a ooforectomia, devido à relação da osteoporose humana com a depleção de estrogênio [Kimmel, 2001].

Como os hormônios sexuais femininos são produzidos pelo ovário, o aumento de peso observado nos animais ooforectomizados deve-se ao fato de, quando realizada a ooforectomia, é cessada a produção de estrogênio, provocando um desajuste hormonal devido à deficiência de estrogênio, aumento da ingestão de alimentos e consequente aumento da massa corporal. Esse aumento é o mesmo descrito por Danielsen *et al.*, (1993), Ignacio *et al.*, (2009) e Vasconcellos *et al.*, (2005) comparando ratos fêmeas Sprague-Dawley controles com ooforectomizadas. Observa-se um aumento gradativo mostrando que o procedimento está funcionando, sendo que na terceira semana os animais apresentam o início de um quadro osteopênico e no final do experimento eles estão com o início de um quadro de osteoporose. Em nossos dados observamos que os ratos fêmeas nude Rowett também apresentaram um aumento de peso corporal, sendo o mesmo relatado por Sass e colegas (1997). Esse aumento pode ser devido a um aumento da ingestão alimentar, já que a deficiência de estrogênio causaria uma diminuição da saciedade os animais diminuíram o gasto energético ficando mais tempo parados. Contudo, esse aumento de peso corporal em animais ooforectomizados pode variar quanto à

espécie. Martin e colegas (1987) mostraram que não há mudanças significativas entre o peso inicial e final em cães induzidos à osteoporose por ooforectomia. Entretanto, Shen e colegas (1992) observaram um aumento de peso significativo em cães beagles. Desse modo é possível observar que a literatura ainda é muito controversa sobre o aumento de peso em cães beagles ooforectomizados.

A osteopenia é caracterizada como sendo o início da perda óssea, podendo ser medida através de exames de raio-x do osso. Egermann e colegas (2005) viram que a diminuição relativa da densidade mineral óssea devido à ooforectomia é menor em ratos do que em humanos osteoporóticos. Porém, em macacos o grau de osteopenia é pequeno quando comparado a ratos, mas esse grau pode ser comparado ao das mulheres osteoporóticas.

Há trabalhos que medem a DMO a partir do conteúdo mineral ósseo (g/cm^2) [Jerome & Peterson, 2001; Geesink *et al.*, 1999; Diwan *et al.*, 2013] ou do conteúdo do volume ósseo (g/cm^3) [Lill *et al.*, 2002], desse modo neste trabalho decidimos avaliar ambos os parâmetros. As medidas do g/cm^3 mostraram uma pequena diminuição a partir dos 60 dias em ambas as linhagens. Esse dado é consistente ao apresentado por Barengolts *et al.*, (1993), que mostrou uma perda de densidade mineral óssea em ratos ooforectomizados. Kasra e Grynpas (1994) observaram que a densidade mineral óssea começou a diminuir a partir da quarta semana e em oito semanas os animais ooforectomizados apresentavam uma redução de 23% comparado ao grupo controle. Lill e colaboradores (2002) também mostrou que sete meses após a indução da osteoporose por ooforectomia, a densidade mineral óssea do osso esponjoso dos animais ooforectomizados foi significativamente menor em comparação ao grupo controle. No estudo de Barengolts *et al.*, (1993) e de Balena e colegas (1993), a obtenção de uma diferença significativa da densidade mineral óssea entre o grupo controle e o grupo ooforectomizado só foi possível meses (3-6 meses) após a indução da osteoporose.

A densidade mineral óssea também apresenta valor reduzido em minipigs [Mosekilde *et al.*, 1993], ovelhas [Lill *et al.*, 2002 e 2003; Zarrinkalam *et al.*, 2009] e macacos [Kasra & Grynpas, 1994; Jerome & Peterson, 2001; Balena *et al.*, 1993] ooforectomizados.

Após o procedimento de ooforectomia é esperado que ocorra uma diminuição dos níveis do hormônio estrogênio, devido à deficiência ocasionada pela retirada dos ovários. Em um estudo de Martin e colegas (1987), em cães beagles

ooforectomizados os níveis de estrogênio tiveram redução significativa durante as oito semanas pós-cirurgia e permaneceram baixos até o final do experimento que teve duração de 48 semanas. Turner (2001) observou que a sensibilidade da deficiência de estrogênio em modelos animais ooforectomizados pode ser aumentada em relação à frequência de ciclos estrais dos animais. Em nosso estudo, os resultados obtidos para a dosagem de 17β -estradiol não foram conclusivos.

Quando ocorre a deficiência de estrogênio, que pode resultar em osteopenia ou a osteoporose, é esperado que ocorra uma diminuição do número de trabéculas ocasionando amplos espaços vazios, uma diminuição do osso cortical e um aumento da cavidade medular. Neste trabalho foi observado a diminuição das trabéculas ósseas e, como consequência, um aumento dos espaços vazios nos animais ooforectomizados das duas linhagens analisadas, Sprague-Dawley e nude Rowett, após 60 dias de cirurgia. Esse dado é condizente com o descrito por Mitlack e colaboradores (1996) para ratos fêmeas Sprague-Dawley, que observaram que a osteopenia geralmente é constituída por pequenas trabéculas esparsas, sendo possível observar grandes lacunas de reabsorção. Em um estudo feito por Sass e colaboradores (1997), eles observaram perdas significativas no volume ósseo trabecular em ratos fêmeas nude Rowett ooforectomizadas. Eles também verificaram que a reabsorção superou a formação óssea nesses animais.

Jee e Yao (2001), relataram que em ratos ooforectomizados ocorre um aumento da reabsorção óssea induzindo a um aumento da cavidade da medula e uma mudança lenta do osso cortical. Nos dados obtidos para os ratos fêmeas Sprague-Dawley e nude Rowett foi observado esse aumento relatado para a medula óssea, porém não foi observada nenhuma mudança em relação ao osso cortical em 60 dias após a indução da osteoporose por ooforectomia. De acordo com Danielsen e colegas (1993), eles observaram que a ooforectomia tem pouco influência na qualidade e composição do osso cortical.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter animais da linhagem nude Rowett, submetidos à cirurgia de ooforectomia, com o mesmo perfil osteoporótico que o da linhagem Sprague-Dawley, linhagem de rato amplamente utilizada na literatura como modelo de estudo. Ambas as linhagens apresentaram aumento no peso da massa corpórea, uma tendência à diminuição na massa mineral óssea e alterações na mudança na estrutura óssea (trabéculas mais finas, osso trabecular mais fino e mais tecido medular) indicando a indução do processo osteoporótico. Entretanto, não é possível concluir que em 60 dias foi obtido o processo completo de osteoporose na linhagem analisada. Para isto recomenda-se que os animais sejam mantidos por 90 a 120 dias após o procedimento de ooforectomia e de preferência associado a uma dieta pobre em cálcio. Com estas modificações acredita-se que será possível obter um modelo osteoporótico versátil utilizando ratos nude Rowett, o qual permitirá testes terapêuticos com células-tronco de diferentes espécies e um modelo de estudo para diversas doenças, como por exemplo, a análise de células tumorais humanas na osteoporose.

REFERÊNCIAS

ATMACA, H.; AYDIN, A.; MUSAOGU, R. Modelo experimental de osteoporose: comparação entre ovariectomia e toxina botulínica do tipo A. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 340-343, julho, 2013.

BALENA, R.; TOOLAN, B.C.; SHEA, M.; MARKATOS, A.; MYERS, E.R.; LEE, S.C.; OPAS, E.E.; SEEDOR, J.G.; KLEIN, H.; FRANKENFIELD, D.; QUARTUCCIO, H.; FIORAVANTI, C.; CLAIR, J.; BROWN, E.; HAYES, W.C.; RODAN, G.A. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p.2577-2586, dezembro, 1992.

BARENGOLTS, E.L.; CURRY, D.J.; BAPNA, M.S.; KUKREJA, S.C. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. **Journal of bone and mineral research**, v. 8, n. 8, p. 937-942, agosto, 2009.

BONYADI, M.; WALDMAN, S. D.; LIU, D.; AUBIN, J. E.; GRYNPAS, M. D.; STANFORD, W. L. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5840–5845, maio, 2003.

BRACK, A. S.; RANDO, T. A. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. **Stem Cell Reviews**, v. 3, n. 3, p. 226–37, 2007.

BRINGHURST, F.R.; DEMAY, M. B.; KRANE, S. M.; KRONENBERG, H. M. **Bone and mineral metabolism in health and disease**. LONGO, D. L.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; JAMESON, J. L.; LOSCALZO, J. Harrison's principles of internal medicine. Mcgraw-hill Professional 18 ed, v. 1, parte 16: Endocrinology and metabolism, seção 2: Disorders of bone and mineral metabolism, capítulo 352, p. 4012, agosto, 2011.

CANALIS, E.; MCCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, n. 3, p. 530-537, setembro, 1989.

CENTRELLA, M.; MCCARTHY, T.L.; CANALIS, E. Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat parietal bone. **Endocrinology**, v. 125, n. 1, p. 13-19, 1989.

CERRONI, A.M.; TOMLINSON, G.A.; TURNQUIST, J.E.; GRYNPAS, M.D. Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 113, n. 3, p. 389-410, novembro, 2000.

CHEN, G. X.; ZHENG, S.; QIN, S.; ZHONG, Z. M.; WU, X. H.; HUANG, Z. P.; LI, W.; DING, R. T.; YU, H.; CHEN, J. T. Effect of low-magnitude whole-body vibration combined with alendronate in ovariectomized rats: A random controlled osteoporosis prevention study. **Plos one**, v. 9, n. 5, p. 1-8, maio, 2014.

Chen, X. D.; SHI, S.; XU, T.; ROBEY, P. G.; YOUNG, M. F. Age-related osteoporosis in biglycan-deficient mice is related to defects in bone marrow stromal cells. **Journal of bone and mineral research**, v. 17, n. 2, p. 331–340, fevereiro, 2002.

COSMAN, F.; de BEUR, S.J.; LEBOFF, M.S.; LEWIECKI, E.M.; TANNER, B.; RANDALL, S.; LINDSAY, R. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359-2381, agosto, 2014.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. **Calcified Tissue International**, v. 52, p. 26-33, janeiro, 1993.

DIWAN, A.D.; LEONG, A.; APPELYARD, R.; BHARGAV, D.; FANG, Z.M.; WEI, A. Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 47, n. 6, p. 540-547, novembro, 2013.

DRAKE, M.T.; CLARKE, B.L.; LEWIECKI, E.M. The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 8, p. 1837-1850, 2015.

EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 2, p. S129–S138, março, 2005.

ERIKSEN, E.F.; HALSE, J.; MOEN, M.H. New developments in the treatment of osteoporosis. **Acta Obstetricia et Gynecologica**, v. 92, p. 620-636, 2012.

FABRE-NYS, C.; GELEZ, H. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. **Hormones and Behavior**, v. 52, n.1, p. 18-25, junho, 2007.

FARID, S.; HUSSAIN, M. M.; ASAD, M. Adrenocortical response to 17-beta estradiol replacement in oophorectomized female Sprague-Dawley rats. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 23, n. 10, p. 695-698, outubro, 2013.

GEESINK, R.G.T.; HOEFNAGELS, N.H.M.; BULSTRA, S.K. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. **The journal of bone and joint surgery**, v. 81, p. 710-718, novembro, 1999.

GENTRY, R.T.; WADE, G.N. Sex differences in sensitivity of food intake, body weight, and running-wheel activity to ovarian steroids in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 90, n. 8, p. 747-754, agosto, 1976.

HADDAD, P.T.; SALAZAR, M.; HERNANDES, L. Histomorfometria da matriz orgânica do fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio. **Brasil Ortopedia**, v. 50, n. 1, p. 100-104, 2015

HENDRICKX, A. G.; DUKELOW, W. R. **Reproductive Biology**. BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. Nonhuman primates in biomedical research: Biology and management. Academic Press, 1 ed, p. 147-191, capítulo 9, p. 512, 1998.

HOCK, J.M.; CANALIS, E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. **Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 1423-1428, março, 1994.

IGNACIO, D.L.; FRANKENFELD, T.G.P.; FORTUNATO, R.S.; VAISMAN, M.; CASTRO, J.P.S.W.; CARVALHO, D.P. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 3, p. 310-317, abril, 2009

JEE, W.S.S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v.1, n. 3, p. 193-207, março, 2001.

JEROME, C.P.; PETERSON, P.E. Nonhuman primates models in skeletal research. **Bone**, v. 29, n. 1, p. 1-6, julho, 2001.

JEROME, C. P.; KIMMEL, D.B.; MCALISTER, J.A.; WEAVER, D.S. Effects of ovariectomy on iliac trabecular bone in baboons (*Papio anubis*). **Calcified Tissue International**, v. 39, p. 206-208, setembro, 1986.

JEROME, C.P.; CARLSON, C.S.; REGISTER, T.C.; BAIN, F.T.; JAYO, M.J.; WEAVER, D.S.; ADAMS, M.R. Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Maca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. **Journal of bone and mineral research**, v. 9, p. 527-540, abril, 1994.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-192, dezembro, 1991.

KASRA, M.; GRYNPAS, M. D. Effect of long-term ovariectomy on bone mechanical properties in young female cynomolgus monkeys. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 557-561, setembro-outubro, 1994.

KATSARA, O.; MAHAIRA, L. G.; LLIOPOULOU, E. G.; MOUSTAKI, A.; ANTSAKLIS, A.; LOUTRADIS, D.; STEFANIDIS, K.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M.; PEREZ, S.A. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 9, p. 1549-1561, setembro, 2011.

KHAJURIA, D.K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 3, p. 462-470, maio-junho, 2012

KIMMEL, D.B. **Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research**. Marcus, R.; Feldman, D.; Kelsey, J. Osteoporosis 2 ed. Academic Press, 2001, p. 29-37, capítulo 37, v. 2.

LANE, N.E.; KELMAN, A. A review of anabolic therapies for osteoporosis. **Arthritis Research & Therapy**, vol. 5, n. 5, p. 214-222, agosto, 2003.

LASOTA, A.; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental osteoporosis-different methods of ovariectomy in female white rats. **Roczniki Akademii Medycznej W Białymstoku**, v. 49, n. 1, p. 129-131, 2004.

LILL, C.A; HESSELN, J.; SCHLEGEL, U.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a

large animal model of osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v.21, n. 5, p. 836-842, setembro, 2003.

LILL, C.A.; GERLACH, U.V.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 5, p. 407–414, maio, 2002.

LIU, Y.; WU, J.; ZHU, Y.; HAN, J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. **Clinical and Experimental Medicine**, v.14, n. 1, p. 13-24, fevereiro, 2012.

LORENTZON, M.; CUMMINGS, S.R. Osteoporosis: the evolution of a diagnosis. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 6, p. 650–661, junho, 2015.

MARTIN, R.B.; BUTCHER, R.L.; SHERWOOD, L.L.; BUCKENDAHL, P.; BOYD, R.D.; FARRIS, D.; SHARKEY, N.; DANNUCCI, G. Effects of ovariectomy in beagle dogs. **Bone**, v. 8, n. 1, p. 23-31, 1987.

MATKOVIC, V. Calcium and peak bone mass. **Journal of Internal Medicine**, v. 231, n. 2, p. 151-160, fevereiro, 1992.

MILLER, P. D.; CANALIS, E.; GASS, M. L. S. Osteoporosis: A new era in recognition and treatment. Acesso em: <http://www.medscape.org/viewarticle/461563_1>, fevereiro, 2017.

MITLAK, B.H.; FINKELMAN, R.D.; HILL, E.L.; LI, J.; MARTIN, B.; SMITH, T.; D'ANDREA, M.; ANTONIADES, H.N.; LYNCH, S.E. The effect of systemically administered pdgf-bb on the rodent skeleton. **Journal of bone and mineral research**, v. 11, n. 2, p. 238-247, fevereiro, 1996.

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

MOSEKILDE, L, WEISBRODE, S.E.; SAFRON, J.A.; STILLIS, H.F.; JANKOWSKY, J.L.; EBERT, D.C.; DANIELSEN, C.C.; SGAARD, C.H.; FRANKS, A.F.; STEVENS, M.L.; PADDOCK, C.L.; BOYCE, R.W. Calcium restricted ovariectomized Sinclair S-1 Minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. **Bone**, v. 14, n. 3, p. 379-382, junho, 1993b.

MOSEKILDE, L. Normal age-related changes in bone mass, structure and strength consequences of the remodeling process. **Danish Medical Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 65-83, março, 1993c.

MUSCHLER, G. F.; NITTO, H.; BOEHM, C. A.; EASLEY, K. A. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, n. 1, p. 117-25, janeiro, 2001.

OCARINO, N. M.; BOELONI, J. N.; JORGETTI, V.; GOMES, D. A.; GOES, A. M.; SERAKIDES, R. Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. **Connective Tissue Research**, v. 51, n. 6, p. 426-33, dezembro, 2010.

NADLER, R. D. Primate menstrual cycle. Acesso em: <<http://pin.primate.wisc.edu/aboutp/anat/menstrual.html>> janeiro, 2017.

NAGAI, S.; HIROYUKI, S. Mechanical strength of bone in canine osteoporosis model: relationship between bone mineral content and bone fragility. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 2, n. 6, p. 428-433, novembro, 1997.

NAZEMI, F.; SALEHIKIA, A.; MARANDI, S. M.; SAHDADI, A. Impact of a 12 week resistance and concurrent training on bone mechanical strength and mineral density of osteoporotic male Wistar rats. **Feyz Journal**, v. 20, n. 2, p. 108-117, junho, 2016.

NETO, P.V.; PECCARO, C.A.; BALDUCCI, E.Z. Análise histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias de ratos castrados submetidos ao efeito do alendronato sódio. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 58, n. 4, p. 491-496, outubro-dezembro, 2010.

PICHE, J.E.; GRAVES, D.T. Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. **Bone**, v. 10, n. 2, p. 131-138, 1989.

RAMALHO, A.C.; CASTRO, M.L. Fisiopatologia da Osteoporose Involutiva. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 409-41, 1999.

RECKER, R.R.; DAVIES, K.M.; HINDER, S.M.; HEANEY, R.P.; STEGMAN, M.R.; KIMMEL, D.R. Bone gain in young adult women. **JAMA**, v. 268, n. 17, p. 2403-2408, novembro, 1992.

REINWALD, S.; BURR, D. Perspective review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. **Journal of bone and mineral research**, v. 23, n. 9, p.1353-1368, setembro, 2008.

RICHARD, D.; ROCHON, L.; DESHAIES, Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. **American Journal of Physiology**, v. 253, n. 5, p. 740-745, novembro, 1987.

RIGGS, B.L.; PECK, W.A.; BELL, N.H. **Physician's resource manual on osteoporosis: a decision-making guide**. 2 ed. The Foundation, 1991, p. 38

RUBIN, M.R.; BILIZEKIN, J.P. New anabolic therapies in osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 285–307, março, 2003.

SAMBROOK, P.; COOPER, C. Osteoporosis. **Lancet**, v. 367, n. 9527, p. 2010-2018, junho, 2006.

SASS, D.A.; LISS, T.; BOWMAN, A.R.; RUCINSKI, B.; POPOFF, S.N.; PAN, Z.; MA, Y.F.; EPSTEIN, S. The role of the T-Lymphocyte in estrogen deficiency osteopenia. **Journal of bone and mineral research**, v. 12, n. 3, p.479-489, março, 1997.

SEABRA, D. I.; POMPEU, E.; VALENTI, M. L. G. Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais. p. 1-8

SHEN, V.; DEMPSTER, D. W.; BIRCHMAN, R.; MELLISH, R. W. E.; CHURCH, E.; KOHN, D.; LINDSAY, R. Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in ovariectomized dogs. **Bone**, v. 13, n. 4, p. 311-316, 1992.

SOUZA, M. P. G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Brasil Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220-229, maio-junho, 2010.

SPENCER, G. R. Pregnancy and lactational osteoporosis. Animal model: porcine lactational osteoporosis. **American Journal of Pathology**, v. 95, n.1, p. 277-280, abril, 1979.0,

TROUNSON, A.; THAKAR, R. G.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical trials for stem cell therapies. **BMC Medicine**, v. 9, n. 52, p. 1-7, maio, 2011.

TURNER, A. S. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. **European Cells and Materials**, v. 22, n. 1, p. 66-81, junho, 2001.

VANDERSTEENHOVEN, J.; BELL, N. H. The effects of ovariectomy and 17/B-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. **Journal of bone and mineral research**, v. 2, n. 2, p. 115-122, abril, 1987.

VASCONCELLOS, L. S.; SABINO, K. R.; PETROIANU, A. Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 32, n. 3, p. 132-135, 2005.

WANG, X.; HUANG, J.; HUANG, F.; ZONG, J. C.; TANG, X.; LIU, Y.; ZHANG, Q. F.; WANG, Y.; CHEN, L.; YIN, L. J.; HE, B. C.; DENG, Z. L. Bone morphogenetic protein 9 stimulates callus formation in osteoporotic rats during fracture healing. **Molecular medicine reports**, v. 15, p. 2537-2545, 2017.

WANG, Z.; GOH, J.; DAS DE, S.; GE, Z.; OUYANG, H.; CHONG, J. S.; LOW, S. L.; LEE, E. H. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 7, p. 1753–61, julho, 2006.

WEIBEL, E. R.; TAYLOR, C. R.; BOLIS, L. **Principles of animal design: The optimization and symmorphosis debate**. 1 ed. Cambridge University Press, 1998, p. 314, capítulo 4.4.

WASNICH, R.D. Epidemiology of osteoporosis. **Osteoporosis international**, v. 7, n. 3, p. S68-S72, 1997.

ZARRINKALAM, M. R.; BEARD, H.; SCHULTZ, C.G.; MOORE, R. J. Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. **European Spine Journal**, v. 18, n. 2, p. 244–253, fevereiro, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumo do ciclo estral dos modelos animais para osteoporose- Dados coletados a partir de Hendrickx *et al.*,1998; Weibel *et al.*,1998; Kimmel, 2001; Reinwald & Burr, 2008; Nadler, 2017.

	Atributos	Aves	Camundongo	Rato	Cão	Porco	Ovelha	Cabra	Primatas	Humano (pré-menopausa)	Humano (pós-menopausa)
	Fases de crescimento	OK	OK	OK	Sim	Sim	Sim		Sim	Sim	
	Ciclicidade menstrual/ estro	Ovulação diária	4- 6 dias poliestro	4- 5 dias poliestro	205 dias (7 meses) monoestro	19- 21 dias poliestro	17-21 dias sazonalmente poliestro	21 dias sazonalmente poliestro	21-28 dias	28 dias	NA
	Tempo médio aproximado de estro	NA	12 horas	12 horas	7-9 dias	48-60 horas	12-24 horas	40 horas	4-6 dias (orangotango) 2-3 dias (gorilas) 10-14 dias (chimpanzé)	NA	NA
	Menopausa natural	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	NA
	Resposta ao estrogênio	Formação βz3	Formação βz3	Turnover βz4	Não é consistente	NA	NA	NA	Turnover βz4	Turnover βz4	NA
Durante ciclo reprodutivo	Pico aproximado [E ₂ *] (pg/ml)	NA	NA	35±12	60-70	40	8-10 20.8	20-30	NA	-300-600 -150-200	NA
	Aproximado basal [E ₂ *] (pg/ml)	NA	NA	10-15	<20	10-16	2-3	5-10	NA	-100 -50	NA
Após o período reprodutivo	Aproximado [E ₂ *] (pg/ml)	NA	NA	9±5 6.6±1.2 8.9±1.6 6.5 1	22.6 ±6.6 22.0±3.7 8.9±1.6 6.5 1	5.5±1.6 <10	1.2±0.18 <5 ND	(-42%) (-52%)	NA	Mulher jovem <30 yr Mulher idosa >30 yr	14±1
	Tempo após	2 anos	NA	7 dias	1 mês	16 sem	1 sem	1 mês	NA		2 anos pós-M

castração ou menopausa (M)	pós-M		4 sem	3 meses 8.5 meses 1 ano 48 sem	3-6 meses	4 sem 4-6 sem	6 meses			
Perda óssea após depleção de estrogênio	NA	Provável	Sim	Não é consistente	Fraca	Fraca	Sim	Sim	Sim	Sim
Desenvolvimento de fraturas osteoporóticas	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Remodelamento esponjoso	Não	Não	Pouca	Sim	Sim	Sim	NA	Sim	Sim	NA
Remodelamento de Havers	Não	Não	Níveis baixos: induzíveis	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Presente (sítio de estudo difícil)	NA
Compressão de tempo	NA	Sim	Sim	Não	Pouco	Pouco	NA	Pouco	Não	NA
Conveniência	Sim	Sim	Sim	Fraco	Pobre	Pobre	NA	Depende	OK	OK
Faixa de dose de medicamento, como humanos	NA	Não	Não (1/100)	Perto	NA	NA	NA	Sim	Sim	NA
Custo-eficácia	No	Sim	Sim	Fraco	Fraco	Sim	NA	Sim	Sim	NA

* Concentração de estradiol - As concentrações circulantes de estradiol podem variar com a raça e idade dos animais, a estação e o ensaio realizado. Portanto, esta tabela fornece uma breve visão geral de alguns dos valores que foram citados em publicações de pesquisa. NA, não aplicável

Fonte: AZZI, C.M.G,2017

APÊNDICE B – Vantagens e desvantagens dos modelos animais para osteoporose.

Modelo animal	Vantagens	Desvantagens	Referências
Ave	O esqueleto da ave apresenta perda óssea localizada durante a imobilização e aumento da massa óssea durante cargas mecânicas aplicadas.	As aves geralmente apresentam remodelação pouco esponjosa ou de Havers. O acúmulo de osso relacionado ao nível de estrogênio sugere uma desintegração fundamental da fisiologia dos mamíferos adulto.	Revisto por by Kimmel, D. B. Osteoporosis, 2º ed. 2001.
Camundongo	Os camundongos são usados devido aos aspectos fisiológicos para a pesquisa esquelética. Podem ser utilizados em estudos genéticos e tem sido bons modelos para os seres humanos quando o assunto é osteoporose.	Há poucos dados validando o camundongo como um modelo para osteoporose e, como o rato, o osso cortical não apresenta diminuição após a ooforectomia. O ciclo estral do camundongo não é similar quando comparado ao ciclo dos humanos. As formações da superfícies endocorticais têm uma resposta aberrante ao estradiol, sendo esse processo relacionado à idade.	Revisto por by Kimmel, D. B. Osteoporosis, 2º ed. 2001.
Rato	Animais de laboratório comuns devido ao seu tamanho, temperamento e disponibilidade de cepas geneticamente homogêneas.		Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001
	O estudo pode ser conduzido em condições muito padronizadas, é relativamente barato e de curto prazo.	Os ratos têm um padrão de osso diferente, epífises abertas com idade de 12 a 24 meses (dependendo dos sítios esqueléticos), hematopoiese na maioria dos sítios esqueléticos ao longo da vida, têm pouca remodelação óssea intracortical, porém uma remodelagem óssea pronunciada ao longo da vida.	Mosekilde, L. Bone. 1995
	Os ratos têm ossos lamelares e esponjosos. É fácil realizar testes biomecânicos em ossos de ratos sob condições padronizadas. A anatomia do esqueleto do rato tem muitas semelhanças com o esqueleto humano e a ooforectomia pode produzir alterações na rede esponjosa idênticas às observadas no esqueleto humano durante o envelhecimento e a menopausa		
	O rato ooforectomizado é um excelente modelo que simula corretamente as características clínicas mais importantes do esqueleto humano adulto.	Exibe baixos níveis de remodelação de Havers, muitas vezes não detectável.	Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001
Cobaia	É menos dispendioso do que alguns dos modelos maiores e tem algumas semelhanças com	A deficiência de estrogênio em cobaias não tem consequências sobre a massa óssea. Parece	Revisto por Turner, A. S. European Cells and

	humanos.	improvável que seja um modelo útil para a osteoporose humana.	Materials. 2001
Coelho	Animais de laboratório comuns devido ao seu tamanho, temperamento e disponibilidade de cepas geneticamente homogêneas.		Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001
	Os coelhos adultos têm uma remodelação de Havers ativa e podem servir de modelo para testar a remodelação de Havers após o tratamento com agentes com fortes efeitos anabolizantes sobre o osso esponjoso.	O seu ciclo reprodutivo tem uma dissimilaridade com a dos humanos.	Revisto por by Kimmel, D. B. Osteoporosis, 2º ed. 2001.
Gato	A osteopenia pode ser induzida em gatos em crescimento através da imobilização, com uma dieta com baixo teor de cálcio ou alta em fósforo.	São animais de companhia e a aceitação pública do uso de gatos na pesquisa é um problema crescente.	Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001
Cão	Menos caro do que o primata e de mais fácil manuseio. São monogástrico.	O esqueleto canino tem uma resistência à deficiência de estrogênio natural ou recessão artificial de estrogênio.	Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001
	Possuem osso cortical com um sistema de Havers e manifestam processos de remodelação óssea cortical e esponjosa interna similares aos humanos.	O volume de osso esponjoso ou diminui ou permanece inalterado.	Revisto por Egermann, M <i>et al.</i> Osteoporosis International, 2005.
Porco	O metabolismo do osso, o ciclo estral e a função gastrointestinal dos suínos são características positivas para esta espécie como modelo.	O custo e a dificuldade de obtenção dos animais em certas áreas são problemas logísticos. A habitação e o manuseio são mais difíceis.	Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001
		Os porcos de fazenda são grandes e podem ser agressivos, tornando-os inconvenientes para uso em projetos que requerem uma grande quantidade de manipulação e interação.	
Ovelha	São animal menos caro do que porcos ou cães, e seu tamanho é propício para a inserção de implantes protéticos comparáveis aos implantados em seres humanos.	Os sistemas gástricos são diferentes dos seres humanos, consequentemente, o modo de ação de alguns nutrientes, produtos farmacêuticos ou outros materiais bioativos administrados por via oral podem ser alterados em animais poligástricos antes da absorção em seu verdadeiro estômago glandular.	Reviewed by Reinwald S and Burr D, 2008. Journal of bone and mineral research.
Primatas humanos	não- Os sistemas de órgãos se assemelham mais aos sistemas humanos (trato gastrointestinal, sistema endócrino e metabolismo ósseo).	As fêmeas cynomolgus ooforectomizadas não parecem ser um modelo útil para o estudo da perda óssea pós-menopausa e a aquisição de primatas fêmeas idosas é difícil e muito dispendiosa.	Revisto por Turner, A. S. European Cells and Materials. 2001

As fêmeas menstruam mensalmente e possuem padrões hormonais semelhantes aos do ser humano.	O primata quando agressivo pode ser suficientemente controlado por um técnico qualificado, mas o risco de transmissão de doenças zoonóticas dos animais é relativamente alto (retrovírus).	Revisto por Egermann, M <i>et al.</i> Osteoporosis International, 2005.
Têm um ciclo mensal (28 dias) e padrões hormonais, incluindo níveis de estrogênio e progesterona semelhantes aos dos humanos. A diminuição da função ovariana e ciclos menstruais irregulares semelhantes aos da mulher perimenopausa e pós-menopausa ocorrem em macacos ao longo de 20 anos e em babuínos com mais de 15 anos de idade.	O uso experimental desta espécie é limitado por razões de ética, custo e problemas de manuseio.	

Fonte: AZZI, C.M.G,2017