UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA CLARA DE OLIVEIRA

Efeitos da eletroacupuntura na regeneração de defeito ósseo em tíbias de ratas
ovariectomizadas

Ribeirão Preto

2019

ANA CLARA DE OLIVEIRA

**Efeitos da eletroacupuntura na regeneração de defeito ósseo em tíbias de
ratas ovariectomizadas**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Aline de
Azevedo

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Oliveira, Ana Clara

Efeitos da eletroacupuntura na regeneração de defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas. Ribeirão Preto, 2019.

74 f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientadora: Aline de Azevedo.

1. Osteoporose 2. Ovariectomia. 3. Eletroacupuntura. 4. Regeneração Óssea

Esta dissertação foi redigida de acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT)

Nome: Oliveira, Ana Clara

Título: Efeitos da eletroacupuntura na regeneração de defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

***Ao meu avô Paulo Flávio Oliveira (em memória)
por ter me ensinado o verdadeiro valor da vida, do amor e da família.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por cobrir minha vida de bênçãos e por colocar pessoas incríveis ao longo deste percurso.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano pelos conselhos, por todo incentivo e por ser uma grande inspiração, pela preocupação em todos os momentos e pelos valores humanos ensinados.

À orientadora Dra. Aline de Azevedo pela forte presença em minha evolução e amadurecimento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Nogueira-Barbosa, pela coordenação do programa de pós-graduação, pelo profissionalismo e dedicação.

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon, por disponibilizar o acesso ao laboratório e os recursos indispensáveis para a realização do experimento.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Francisco Mazzocato, Rita Cossalter, Ismar Ribeiro e Maria Teresinha de Moraes, pela amizade construída, por toda a ajuda e convivência.

À Dra. Ana Paula Macedo pela amizade, preocupação e carinho; às técnicas de Laboratório da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Nilza Letícia Magalhães e Viviane de Cássia Oliveira, e a especialista de laboratório Junia Ramos pela disposição, profissionalismo, e pelos conselhos que me ajudaram a seguir em frente.

À técnica de laboratório Sandra de Oliveira Conde Tella, ao Dr. Evandro Manoel Neto Neves, e a fisioterapeuta Jackeline Tida, sempre disponíveis e solícitos para ajudar todas as vezes que recorri.

Ao Dr. Ricardo Tadeu Lopes, que cordialmente me auxiliou e disponibilizou todos os recursos ao seu alcance para que eu concluísse essa fase.

Às minhas amigas Bruna Leonel Carlos e Jéssica Suzuki Yamanaka por todos os momentos compartilhados, bons e ruins, agradeço pelos conselhos e por me ajudarem a seguir em frente.

Aos meus companheiros de pós-graduação, Roberta Shimano, Carla Teresa Barbosa, Marcela Britto de Paiva, Leonardo Rigobello, que fizeram do convívio do dia a dia momentos mais alegres.

Ao Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu noivo Michael de Castro pelo companheirismo e apoio, por me ajudar a ser mais forte e por ser o meu melhor amigo e estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais Darly Pereira Oliveira e Paulo Alexandre Oliveira, e meu irmão Paulo Flávio D. Oliveira, por serem presença constante e amor incondicional mesmo de longe, mantendo em minha casa a principal fonte de energia e de coragem para seguir.

Às minhas avós Maria Roselene e Expedita Oliveira, pela ternura e carinho, e todos os meus familiares, por jamais permitirem que a distância física nos separe e mantêm a nossa família unida e cheia de amor.

RESUMO

OLIVEIRA, A. C. (2019). *Efeitos da eletroacupuntura na regeneração de defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas*. 74 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

A Osteoporose é uma doença osteometabólica caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea e consequente redução da resistência óssea que predispõe a um aumento no risco de fratura. Em mulheres na pós-menopausa, a deficiência hormonal pode promover tanto as formas precoces como tardias de osteoporose. Além disso, estudos tem relacionado a osteoporose a atrasos na regeneração óssea. A aplicação da eletroacupuntura (EA) para o tratamento da osteopenia osteoporose é recente, entretanto estudos apresentaram resultados benéficos após utilização da técnica. O presente estudo tem como objetivo verificar os possíveis efeitos da terapia com EA na regeneração de defeitos ósseos em tíbias de ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 48 ratas fêmeas, da linhagem *Sprague-Dawley* divididas aleatoriamente em 4 grupos experimentais: OVXDO (ovariectomia + defeito, sem EA), SDO (SHAM + defeito ósseo, sem EA), OVXDOA (ovariectomia + defeito ósseo + EA), e SDOA (SHAM e defeito ósseo + EA). Os animais tratados foram estimulados por 20 minutos, durante o período de 3 ciclos de 10 dias, com intervalo de 1 dia entre eles, nos acupontos *Sanyinjiao* (SP6) e *Zusanli* (ST36). Após 125 dias de experimento, os animais foram submetidos a eutanásia O defeito ósseo das tíbias dos grupos experimentais foram avaliados por análises histológicas, microtomografia computadorizada (Micro-CT), densitometria óssea, ensaio mecânico e análises moleculares dos marcadores ósseos RANKL, OC e MMP-9 por PCR em tempo real (qRT-PCR). Foi realizado teste de variância ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey para a comparação entre os grupos experimentais, com nível de significância de 5%. O grupo OVXDO apresentou valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos para a densidade mineral óssea, para a quantificação de área de osso em lâminas histológicas e para o parâmetro morfométrico BV/TV na análise por micro-CT do defeito ósseo das tíbias. Não foram observadas diferenças significativas nas propriedades mecânicas de força máxima e rigidez relativa, bem como na expressão relativa dos genes analisados por qRT-PCR dos grupos experimentais. Os resultados sugerem que a EA pode apresentar efeitos benéficos para a regeneração óssea em tíbias osteopênicas. Concluiu-se que a EA pode beneficiar o processo de regeneração óssea, bem como ser utilizada como tratamento complementar da osteopenia e osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose, Ovariectomia, Eletroacupuntura, Regeneração Óssea.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. C. (2019). *Effects of electroacupuncture on bone defect regeneration in tibias of ovariectomized rats*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Osteoporosis is an osteometabolic disease characterized by decreased bone mineral density and reduction in bone strength that predisposes to an increased risk of fracture. In postmenopausal women, hormone deficiency can promote both early and late forms of osteoporosis. In addition, studies have shown that osteoporosis delays bone regeneration. The application of electroacupuncture (EA) for the treatment of osteoporosis is recent. However, studies have shown beneficial results after using the technique. The aims of study was to verify the possible positive effects of EA therapy on bone defect regeneration in tibias of ovariectomized rats model. Forty-eight female Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 experimental groups: OVXDO (ovariectomy + defect without EA), SDO (SHAM + bone defect without EA), OVXDOA (ovariectomy + bone defect + EA), and SDOA (SHAM and bone defect + EA). The animals were stimulated for 20 minutes over a period of 3 cycles of 10 days, with an interval of 1 day between them, in the *Sanyinjiao* (SP6) and *Zusanli* (ST36) acupoints. After 125 days of experimentation, the animals were euthanized. The tibial bone defect of the experimental groups was evaluated by histological analysis, computed microtomography (Micro-CT), bone densitometry, mechanical assay and molecular analysis of RANKL, OC and MMP-9 bone markers by real time PCR (qRT-PCR). One-way ANOVA and Tukey post-tests were performed in order to compare the experimental groups, with a significance level of 5%. The OVXDO group had significantly lower values ($p < 0.05$) when compared to other groups: bone mineral density, quantification of bone area in histological slides, and the BV / TV morphometric parameter in the micro-CT analysis of the tibial bone defect. No significant differences were observed in the mechanical properties of maximum strength and relative stiffness, as well as in the relative expression of the genes by qRT-PCR from experimental groups. The results suggest that EA may have beneficial effects in the bone regeneration in osteopenic tibias. In conclusion, the EA may benefit the bone regeneration process and be used as a complementary treatment of osteopenia and osteoporosis.

Key-words: Osteoporosis. Ovariectomy. Eletroacupuncture. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento de ovariectomia.....	33
Figura 2: Procedimento cirúrgico para execução do defeito ósseo.	34
Figura 3: Broca trefina acoplada ao Micro Motor 210/105L, Strong®.....	35
Figura 4: Sistema de sedação com anestésico inalatório.....	35
Figura 5: Manutenção do animal em sedação por meio de máscara adaptada.	36
Figura 6: Delimitação do ROI sobre o defeito ósseo.....	38
Figura 7: Demonstração da área do defeito ósseo corado por meio de técnica de Tricômico de Masson.....	38
Figura 8: Esquema demonstrativo das medidas realizadas para o posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo.....	40
Figura 9: Tíbia direita posicionada nos aparatos da máquina universal de ensaios para realização do ensaio mecânico de flexão bi-apoiado.....	41
Figura 10: Concentração de FSH nos grupos experimentais.....	45
Figura 11: Massa Corporal dos animais a cada semana de experimento	46
Figura 12: Defeito ósseo de tíbias no plano transversal	47
Figura 13: Resultados obtidos por meio da análise de Micro-CT dos grupos experimentais ..	48
Figura 14: Resultados da análise de densidade mineral óssea.....	49
Figura 15: Resultados obtidos por meio do ensaio mecânico	49
Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito ósseo.....	50
Figura 17: Resultados da análise quantitativa de área de osso	51
Figura 18: Expressão relativa dos genes dos grupos experimentais.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros utilizados para aquisição de imagens no microtomógrafo 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais	32
Tabela 2: Sequência de iniciadores utilizados	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto	
USP	Universidade de São Paulo	
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	
MicroCT	Microtomografia Computadorizada	
MTC	Medicina Tradicional Chinesa	
DEXA <i>absortimetry</i>	Dupla Emissão de Fonte de Raio X, abreviação do inglês <i>dual energy</i>	<i>X-ray</i>
qRT-PCR <i>real time – polymerase chain reaction</i>	Reação em Cadeia da Polimerase – em Tempo Real, abreviação do	inglês
DMO	Densidade Mineral Óssea	
EA	Eletroacupuntura	
OVX	Cirurgia de ovariectomia	
OVXDOA	Grupo experimental submetido à cirurgia de ovariectomia, defeito ósseo, e tratado com eletroacupuntura	
OVXDO	Grupo experimental submetido à cirurgia de ovariectomia, defeito ósseo, sem tratamento com eletroacupuntura	
SDOA	Grupo experimental submetido à cirurgia de ovariectomia SHAM, defeito ósseo, e tratado com eletroacupuntura	
SDO	Grupo experimental submetido à cirurgia de ovariectomia SHAM, defeito ósseo, sem tratamento com eletroacupuntura	
Runx2	Fator de transcrição Runt	
BMU	Unidade Básica Multicelular, abreviação do inglês <i>Basic Multicellular</i>	<i>Unit</i>
ALP	Fosfatase Alcalina	
Ocn	Osteocalcina	
Opn	Osteopontina	
ER α	receptor de estrógeno alfa	
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa	
RANK	Receptor ativador do fator kB	

RANKL	Ligante do receptor RANK
OPG	Osteoprotegerina
MCS-F	Fator estimulante de colônia de macrófagos
IL	Interleucina
IGF	Fator de crescimento associado à insulina
OMS	Organização Mundial de Saúde
B20	Acuponto Bexiga 20
B23	Acuponto Bexiga 23
BP6	Acuponto Baço Pancrêas 6
E36	Acuponto Estômago 36
E2	Estradiol
°C	grau Celsius
%	porcentagem
cm	centímetro
mm	milímetro
mL	mililitro
g	grama
rcf	Força Relativa de Centrifugação, abreviação do inglês <i>Relative Centrifugal Force</i>
g/cm ²	grama por centímetro quadrado
mm ³	milímetro cubico
N	Newton
N/mm	Newton por milímetro
Hz	Hertz
mA	miliampere
nm	nanômetro

BV/TV	fração de volume ósseo
Tb.Th	espessura trabecular
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Sp	separação trabecular
g/cm ³	grama por centímetro cúbico
POP.tot	porosidade total
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
CT	ciclo limiar, abreviação do inglês <i>Cycle Threshold</i>
μA	microampere
ΔCT	delta CT
ΔΔCT	delta delta CT

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Tecido ósseo	21
1.2	Regeneração óssea	22
1.3	Osteopenia e osteoporose	23
1.3.1	<i>Osteoporose pós-menopausa</i>	<i>25</i>
1.4	Métodos de indução de osteoporose experimental	25
1.5	Acupuntura	26
1.5.1	<i>Eletroacupuntura (EA)</i>	<i>27</i>
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODO	31
3.1	Ética experimental.....	31
3.2	Animais experimentais	31
3.2.1	<i>Alojamento</i>	<i>31</i>
3.3	Grupos experimentais	31
3.4	Procedimentos cirúrgicos	32
3.4.1	<i>Ovariectomia</i>	<i>32</i>
3.4.2	<i>Defeito ósseo</i>	<i>34</i>
3.5	Sedação.....	35
3.6	Protocolo de eletroacupuntura	36
3.7	Eutanásia e coleta de materiais.....	37
3.8	Análise histológica	37
3.9	Microtomografia óssea (Micro-CT)	39
3.10	Densitometria óssea	39
3.11	Ensaio mecânico	40
3.12	Expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR)	41
3.13	Análise do Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	42
3.14	Análise estatística	43
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Análise de FSH	45
4.2	Massa corporal	45
4.3	Micro-CT	46
4.4	DMO	48
4.5	Força máxima e rigidez relativa	49

4.6	Quantificação de neoformação óssea	50
4.7	qRT-PCR	51
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS	63
8	APÊNDICE.....	70
9	ANEXO	76

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado e metabolicamente ativo que fornece suporte estrutural e a facilitação do movimento, fornecendo alavancas para os músculos que permitem a locomoção. Além disso, fornecem proteção de estruturas vitais, reservatórios de minerais e fatores de crescimento, promovendo a regulação da homeostase mineral e um local para a hematopoese (BUCK; DUMANIAN, 2012).

Os três componentes principais do tecido ósseo são representados pelas células ósseas, pela matriz orgânica e pelos minerais. O componente mineral constitui cerca de dois terços do peso seco do tecido ósseo. O osso representa a principal reserva de minerais no corpo, os quais podem ser liberados por meio da reabsorção óssea. O montante mineral é composto essencialmente por cristais de fosfato e cálcio sob a forma de hidroxiapatita, e pequenas quantidades de magnésio e carbonato e sódio (STAGI et al., 2013).

O osso exibe quatro principais tipos de células: osteoblastos, células de revestimento ósseo, osteócitos e osteoclastos. A diferenciação de células ósseas é baseada em sua origem. Os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo se originam de células-tronco mesenquimais conhecidas como células osteoprogenitoras, enquanto os osteoclastos se originam de células-tronco hematopoiéticas. A localização dessas células também varia, células ósseas encontradas ao longo da superfície óssea incluem osteoblastos, osteoclastos e células de revestimento ósseo, enquanto os osteócitos estão localizados no interior do osso (DOWNEY; SIEGEL, 2006; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

As células osteoprogenitoras residem nos canais ósseos, no endóstio, no perióstio e na medula óssea. Estas células permanecem indiferenciadas até receberem sinais para migrarem para um local, proliferar e diferenciarem-se em osteoblastos. Os osteoblastos revestem as superfícies do osso e são consideradas células formadoras de osso, pois sintetizam e secretam matriz óssea orgânica. A atividade dos osteoblastos é marcada pela liberação de fosfatase alcalina. Tais células podem ter um dos três destinos: permanecem estáticas revestindo o osso, tornam-se osteócitos ou retornam às células osteoprogenitoras (BUCK; DUMANIAN, 2012; STAGI et al., 2013).

Os osteócitos são osteoblastos que se cercaram de matriz orgânica para viver em vacúolos chamados lacunas. Uma vez cercados por matriz, eles desenvolvem projeções citoplásmicas que atravessam o osso e entram em contato com os processos celulares dos osteócitos adjacentes, permitindo a comunicação direta. Os osteócitos mantêm a matriz óssea e

medeiam a homeostase do cálcio. Essas células se distinguem pela sua morfologia característica, pela deposição de uma matriz mineralizada, e pela síntese de colágeno tipo I e outras proteínas ósseas especializadas, como a osteonectina (ONC), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OC). A OC é a proteína não colágena mais abundante no osso, sintetizada apenas pelos osteoblastos e odontoblastos, sendo assim um biomarcador de formação óssea importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada (BUCK; DUMANIAN, 2012; KLEIN-NULEND et al., 2015; SZULC, 2018).

Uma vez que a dinâmica do osso envolve a reabsorção pelos osteoclastos e a formação por osteoblastos, continuamente, há evidências de que os osteócitos atuam como mecanossensores e orquestradores desse processo de remodelamento ósseo. Tal processo ocorre de forma assíncrona em todo o esqueleto em locais anatomicamente distintos denominados unidades multicelulares básicas (BMUs) (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; SIMS; MARTIN, 2014).

1.2 Regeneração óssea

A regeneração óssea é um complexo processo biológico que objetiva a reconstituição de uma parte perdida ou afetada do tecido, restabelecendo dessa forma sua função e microarquitetura (LOI et al., 2016). Lesões ósseas causam o rompimento do periósteo, culminando na formação de um coágulo sanguíneo no local que leva ao início de um processo inflamatório agudo, e surgimento de um tecido de granulação. Em seguida, esse tecido é invadido por células osteoprogenitoras que sintetizam e calcificam a matriz óssea, formando assim, o osso primário (ou calo ósseo). Posteriormente, ocorre o remodelamento ósseo substituindo o osso primário por osso secundário (MARSELL; EINHORN, 2011).

Os hormônios e os fatores de crescimento também têm um papel na regulação da função óssea. O estrogênio e a testosterona têm um efeito relevante na remodelação, principalmente pela inibição da degradação óssea. Na literatura está bem caracterizado a presença de um complexo de proteínas envolvidas na via de sinalização do “*turnover*” do remodelamento ósseo (D’AMELIO; ISAIA; ISAIA, 2009; TU et al., 2018). Esse complexo é denominado RANK/RANKL/OPG. O complexo é formado pelo Receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANK); Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B – (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel que inativa o RANKL, e pode interferir no sistema imune, metabolismo ósseo e funções endócrinas, em várias doenças imunológicas e osteometabólicas caracterizadas por reabsorção óssea, incluindo a osteoporose pós-menopausa (BEZERRA et al., 2005; CROCKETT et al., 2011).

O RANKL é uma proteína transmembranosa da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e tem papel central na osteoclastogênese, expresso por osteoblastos e células do estroma, que quando ligado ao receptor RANK em precursores de osteoclastos, induz a formação de osteoclastos.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de 24 proteinases especializadas na clivagem de proteínas extracelulares. Eles podem levar à extensa degradação da matriz extracelular ou a alterações sutis do ambiente pericelular, afetando drasticamente a resposta celular. A MMP-9, classificada como uma gelatinase do tipo IV é uma das gelatinases mais conhecidas na família das MMPs (ANDERSEN et al., 2004; NYMAN et al., 2011). Estudos apontam a MMP-9 como um marcador importante para o diagnóstico precoce da osteoporose, sendo considerada um biomarcador de reabsorção óssea. Além disso, observou-se que a expressão de MMP-9 foi negativamente correlacionada com a densidade mineral óssea (DMO)(ZHENG et al., 2018).

Sendo assim, o sucesso no processo regenerativo do osso depende de um conjunto de fatores que englobam a formação de um coágulo sanguíneo, vascularização local adequada, processo inflamatório controlado, exclusão de tecidos não osteogênicos competitivos, dimensões do defeito ósseo, estabilidade mecânica e presença de células ósseas e fatores de crescimento (AUGAT; CLAES; ECKERT-H, 2002; GIBON; LU; GOODMAN, 2016).

1.3 Osteopenia e osteoporose

A osteopenia é definida como uma redução da massa óssea que antecede à osteoporose e pode ser conhecida como pré-osteoporose. A osteoporose é uma doença osteometabólica caracterizada por baixa densidade mineral óssea (DMO), deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando ao aumento da fragilidade óssea e consequente aumento do risco de fraturas. O pico de massa óssea ocorre com cerca de 30 anos de idade, e posteriormente um processo natural de perda se inicia e ocorre de forma constante. Embora o pico de massa óssea seja altamente dependente da genética, muitos fatores modificáveis podem influenciar a massa óssea, como nutrição, exercícios e certas patologias e fármacos (NARANJO et al., 2013; PÉREZ EDO et al., 2011; TU et al., 2018). Um desequilíbrio na atividade de remodelação, no qual a reabsorção excede a formação, pode resultar nas alterações fisiopatológicas observadas na osteoporose (RAISZ, 2005).

A baixa DMO é um fator de risco que predispõe à fratura, e pode ser mensurada por meio da técnica de absorciometria de dupla energia de raio - X (*Dual-energy x-ray absorptometry* – DXA). A partir de 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu uma medida para

densidade mineral óssea baseada no *T-score* da DMO, na qual *T-score* igual ou inferior a - 2,5 são considerados com osteoporose, e a osteopenia é definida pelo *T – score* entre - 1,0 e - 2,5, enquanto o *T – score* superior a - 1,0 é considerado normal.

COSTA et al (2016) mostraram que a prevalência de osteoporose no Brasil foi de 40%, apontando resultados semelhantes aos dados de um estudo com 600 pacientes feito em Detroit (EUA), no qual foi observada uma prevalência de osteoporose de 52%. Esses relatos mostram que o problema da osteoporose assume a alta prevalência não só em nosso país (CLARK et al., 2009; COSTA et al., 2016; NELSON; MOLLOY; KLEEREKOPER, 1998).

Um estudo realizado por BURGE et al (2007) prevê que a prevalência de osteoporose pode aumentar nos Estados Unidos de aproximadamente 10 milhões de pessoas para mais de 14 milhões de pessoas até 2020, e conseqüentemente, o custo relacionado as fraturas decorrentes da osteoporose deverá exceder US\$ 25 bilhões a cada ano para tratar mais de três milhões de fraturas previstas até 2025, superando a marca de US \$ 17,8 bilhões em custos médicos com hospitalizações, lesões fatais e não fatais catalogados em 2015.

No Brasil, as projeções estimadas para os próximos 10 anos revelam que a quantidade de fraturas de quadril decorrente da osteoporose (atualmente 121.700 fraturas anuais) poderá chegar a 140 mil fraturas de quadril por ano até 2020 (COSTA et al., 2016).

A osteoporose pode ser classificada como primária ou secundária, sendo que a osteoporose primária geralmente se deve à perda óssea que é frequentemente associada à deficiência de hormônios sexuais e envelhecimento e resulta da deterioração contínua das trabéculas no osso. Além disso, a redução da produção de estrogênio em mulheres na pós-menopausa provoca um aumento significativo na perda óssea. Nos homens, a globulina ligadora de hormônios sexuais inativa a testosterona e o estrogênio à medida que o envelhecimento ocorre, o que pode contribuir para a diminuição da DMO com o passar do tempo (“Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of the north American menopause society”, 2010; RALSTON; FRASER, 2015).

A osteoporose secundária é um resultado de várias comorbidades e/ou medicamentos. As doenças implicadas na osteoporose geralmente envolvem mecanismos relacionados ao desequilíbrio de cálcio, vitamina D e hormônios sexuais. As causas de osteoporose secundária podem diferir entre os sexos, sendo mais comumente associado para os homens ao uso excessivo de álcool, o uso de glicocorticóides e o hipogonadismo. (“Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of the north American menopause society”, 2010; TANNENBAUM et al., 2002).

1.3.1 Osteoporose pós-menopausa

A osteoporose pós-menopausa é causada por maior reabsorção do que a formação óssea, como resultado da diminuição do nível de estrogênio e da função ovariana, e caracteriza-se por alterações degenerativas da massa óssea e microestrutura do tecido ósseo (FAN et al., 2016).

O estrogênio é um importante hormônio regulador da homeostase de tecido ósseo, no organismo atua na conservação da massa óssea, controla o remodelamento ósseo e mantém equilíbrio entre a formação e a reabsorção do tecido ósseo. Em nível celular, afeta a geração, vida útil e atividade funcional tanto de osteoblastos como de osteoclastos. Portanto, este hormônio reduz a formação e atividade de osteoclastos, pelo aumento de apoptose (HUGHES et al., 1996; MANOLAGAS, 2000). Assim, tanto as formas precoces e tardias da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, quanto o seu desenvolvimento em homens idosos, podem ser influenciados pela deficiência hormonal (RIGGS; KHOSLA; MELTON, 1998).

A densidade óssea na vida adulta depende do pico de massa óssea atingido na juventude e da taxa subsequente de perda óssea. A massa esquelética atinge o nível máximo na terceira década de vida e depende principalmente da dieta (especialmente cálcio e vitamina D), atividade física e predisposição genética. Durante os primeiros anos após a menopausa, as mulheres podem ter uma perda rápida de osso, até 5% ao ano no osso trabecular e 2% a 3% ao ano no osso cortical. Esta perda pós-menopausa precoce é, principalmente, o resultado do aumento da atividade dos osteoclastos, e coloca as mulheres em um risco maior do que os homens para a fratura osteoporótica. Mais tarde, um declínio na atividade dos osteoblastos predomina e a taxa de perda diminui para 1% a 2% ou menos por ano (LASH et al., 2009).

1.4 Métodos de indução de osteoporose experimental

Existem diferentes métodos experimentais que podem ser utilizados para induzir osteopenia/osteoporose animal. Em ratos, a perda óssea depende do método utilizado, do local avaliado, e principalmente se esta perda é relacionada ao osso cortical ou trabecular. O modelo de ovariectomia em ratas é frequentemente utilizado em pesquisa de osteoporose pós-menopausa, uma vez que causa a deficiência de estrogênio após a retirada dos ovários. Após a intervenção cirúrgica, os modelos experimentais apresentam perda óssea bifásica, com fase inicial de rápida perda óssea em até 100 dias, seguido por um período intermediário de estabilização relativa de volume de osso esponjoso em nível de osteopenia (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; LELOVAS et al., 2008).

De acordo com estudo de Jee e Yao (2001), a perda de osso trabecular inicia-se 14 dias após a ovariectomia em metáfise proximal da tíbia e apresenta início de perda evidente após 30 dias para colo femoral. Tanto a perda de massa óssea como a redução da resistência do osso esponjoso vertebral podem ser detectadas três meses após a ovariectomia, ao passo que alterações no osso cortical da diáfise femoral só podem ser observadas após 9 meses.

1.5 Acupuntura

A acupuntura é uma técnica milenar amplamente praticada na China há mais de 4000 anos, sendo parte integrante da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), e que consiste da inserção e manipulação de agulhas finas em pontos específicos do corpo, denominados acupontos, para atingir fins terapêuticos. Para o entendimento da teoria da acupuntura, deve-se trazer em mente que os conceitos básicos de fisiologia e patologia estão envolvidos no equilíbrio e desequilíbrio das forças *yin* e *yang*, de que os seres vivos têm uma energia interna, conhecida como Qi, que é fluxo dessa energia interior que os sustenta. De acordo com a filosofia da MTC, o Qi equilibrado é vital para a saúde, e seu desequilíbrio ou interrupção no seu fluxo são as causas para o surgimento de doenças. Embora a acupuntura tenha sido desenvolvida para a prevenção da doença, ela é também útil no controle dos sintomas, reintroduzindo o fluxo equilibrado de Qi, seu foco principal (CHEW; KEE, 1963; CHON; LEE, 2013).

Anatomicamente, os pontos de acupuntura foram mapeados correspondendo a áreas cutâneas de alta condutividade elétrica e diferenças histológicas distintas em comparação com tecidos adjacentes. Existem muitas teorias que podem explicar como a acupuntura funciona. A teoria do portão ou controle da dor, bem elucidada na literatura atualmente, preconiza que a acupuntura estimula fibras nervosas inibitórias por um curto período, reduzindo assim a transmissão do sinal de dor para o cérebro (BECKER et al., 1976; CHON; LEE, 2013). Estudos clínicos relataram também que a inserção de agulhas de acupuntura em pontos específicos desencadeiam a produção de endorfinas no líquido cefalorraquidiano (CLEMENT-JONES et al., 1980; JOHNSON, 1999), e a modulação de outros neurotransmissores como serotonina e norepinefrina (KU; CHANG, 2001; YANO et al., 2004).

Na literatura científica, correlações entre acuponto e mecanismos de ação da acupuntura têm sido realizados com elementos do processo inflamatório, em especial, aspectos neurogênicos (ANDERSSON; LUNDEBERG, 1995; CHON; LEE, 2013). Alguns autores sugerem que a acupuntura pode ter efeitos diretos na regulação periférica da liberação de mediadores do processo inflamatório, levando a uma redução da liberação periférica de substância P (SP), um neurotransmissor que desempenha um papel importante na inflamação

neurogênica e pode promover a infiltração de células inflamatórias. Além disso, a substância P pode estimular a secreção de fatores de necrose tumoral (TNF- α) a partir de macrófagos mononucleares, o que sugere que a acupuntura possui efeitos em diversos sistemas, e esses efeitos não podem ser explicados com um único mecanismo e/ou teoria, uma vez que elas coexistem (NICOLETTI et al., 2012; ZHANG et al., 2018).

1.5.1 Eletroacupuntura (EA)

A eletroacupuntura (EA) é uma modificação moderna do método tradicional de acupuntura que estimula os pontos de acupuntura com corrente elétrica em vez de manipulações manuais. Os impulsos elétricos dessa terapia podem fortalecer a estimulação pelo agulhamento em pontos específicos de acupuntura, e podem ser padronizados de acordo com a frequência, voltagem e forma de onda, em contraste com a acupuntura manual (LIN; CHEN, 2008; ZHENG et al., 2018).

A utilização da EA para o tratamento da osteoporose é recente, no qual estudos apresentaram alguns resultados importantes, com melhora da DMO para a quinta vértebra lombar e metáfise proximal do fêmur de ratas da linhagem *Sprague-Dawley* submetidas à ovariectomia (ZHANG et al., 2004; ZHOU et al., 2012), além da melhora da propriedade mecânica do fêmur quanto a força máxima, deflexão, tensão e energia (ZHANG et al., 2006).

Em uma revisão sistemática, PAN et al (2018) apontaram 10 pontos mais comumente utilizados para o tratamento da osteoporose, e entre eles foram mencionados os pontos *Zusanli* (E36), que pode regular o baço e o estômago, nutrir o Qi e suplementar o sangue; e *Sanyinjiao* (BP6), que pode regular as funções do fígado, baço e rim porque é um acuponto de cruzamento dos meridianos dos três órgãos. De acordo com o princípio da seleção do acuponto descrito na MTC, esses acupontos pertencem principalmente aos três meridianos do fígado, baço e rim. Segundo a teoria da MTC, a osteoporose está intimamente relacionada a esses três órgãos, sendo que o princípio do tratamento da osteoporose é acalmar o fígado, tonificar o baço e reforçar o rim.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com eletroacupuntura no processo de regeneração no defeito ósseo realizado em tíbias de ratas ovariectomizadas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de expressão dos marcadores ósseos, entre eles: RANKL, OC e MMP-9 a partir do tecido ósseo (tíbias) dos grupos experimentais, por análise de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR);
- Avaliar a microarquitetura dos defeitos ósseos por meio de análises histológicas;
- Avaliar a qualidade óssea dos defeitos ósseos dos grupos experimentais por análises de microtomografia computadorizada (micro-CT) e densitometria óssea, além das propriedades mecânicas por meio de ensaio mecânico de flexão.

Materiais e Método

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Ética experimental

A realização da fase experimental deste projeto teve início após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), número de protocolo 226/2017 (Anexo A). Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as normas descritas pelo *Internacional Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*.

3.2 Animais experimentais

Foram utilizadas 48 ratas da linhagem *Sprague-Dawley*, com idade média de 6 semanas e com peso corporal de aproximadamente 200 gramas. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP e foram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP.

3.2.1 Alojamento

Os animais foram alojados em gaiolas específicas, de 2 – 3 animais por gaiola, em ambiente calmo, em condições de temperatura normais e controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 55-60% de umidade e ciclo de 12 horas claro/escuro), e se alimentaram com ração padrão para ratos e água *ad libitum*.

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos igualmente em 4 grupos, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais

Grupos Experimentais	Abreviatura	Especificação
Ovariectomia e defeito ósseo	OVXDO	Animais submetidos à ovariectomia e defeito ósseo e não submetidos à EA.
SHAM e defeito ósseo	SDO	Animais submetidos à cirurgia SHAM e ao defeito ósseo e não submetidos à EA.
Ovariectomia e defeito ósseo/Tratamento com acupuntura	OVXDOA	Animais submetidos à ovariectomia, defeito ósseo e tratamento com EA.
SHAM e defeito ósseo/Tratamento com acupuntura	SDOA	Animais submetidos à cirurgia SHAM, ao defeito ósseo e tratamento com EA.

O grupo OVXDO corresponde aos animais que foram submetidos aos procedimentos de ovariectomia e posteriormente ao defeito ósseo, entretanto não foram submetidos ao tratamento com EA (descrito no item <3.6>).

O grupo OVXDOA corresponde aos animais que foram submetidos tanto à ovariectomia quanto ao defeito ósseo, e posteriormente, receberam tratamento com EA.

O grupo SDOA corresponde aos animais que não foram submetidos à ovariectomia, no qual foi apenas simulado o processo cirúrgico; foram submetidos ao defeito ósseo e posteriormente, ao tratamento com EA.

O grupo SDO corresponde aos animais que não foram submetidos à ovariectomia, sendo que somente foi simulado o processo cirúrgico, e posteriormente foram submetidos ao defeito ósseo, sem o tratamento com EA.

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 125 dias após a ovariectomia, como será descrito no item <3.7>.

3.4 Procedimentos cirúrgicos

3.4.1 Ovariectomia

O procedimento cirúrgico para a ovariectomia seguiu a técnica metodológica já descrita por Park, Lee, e Chung (2010) e padronizada no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Os animais foram anestesiados por via intramuscular com Ketamina (95 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg) e, após sedação, foi realizada tricotomia na região lateral entre o rebordo

costal inferior e o início da pelve. Em seguida, foi realizada a assepsia da região de acesso com gaze embebida em polivinil-pirrolidona-iodo.

Para acesso aos ovários, foi realizada uma incisão reta de aproximadamente 1,5 cm de comprimento da pele com auxílio de pinça e tesoura pontiaguda. A parede muscular foi avulsionada, o procedimento cirúrgico de retirada de ovários bilateralmente foi realizado através de acesso via cavidade abdominal lateral. Após localização dos ovários, foi realizada ligadura da trompa uterina com fio de sutura 3-0 Vicryl (Johnson & Johnson®, São José dos Campos), e o ovário foi removido completamente. Posteriormente foi realizada a sutura da parede muscular e da pele, com fio de sutura 4.0 Vicryl® e 4.0 Mononylon Ethilon®, respectivamente. Todo o procedimento foi repetido do lado oposto para a retirada dos dois ovários.

Após a cirurgia, os animais receberam injeção de antibiótico Pentabiótico veterinário pequeno porte com dose equivalente a 0,1 ml para cada animal via intramuscular. A sequência de procedimentos da ovariectomia está ilustrada na figura 1. Os animais do grupo SDO e SDOA foram submetidos à cirurgia até a etapa em que os ovários foram expostos. Eles foram recolocados na cavidade abdominal intactos, em seguida foi realizada a sutura do tecido muscular e subcutâneo.

Figura 1: Procedimento de ovariectomia.

A) Animal anestesiado com tricotomia na região ventral entre a reborda costal inferior e o início da pelve; B) Incisão da pele, de aproximadamente 1,5 cm de comprimento; C) Incisão do músculo para acesso da cavidade abdominal; D) Exposição do ovário; E) Ligadura da região distal da trompa uterina; F) remoção do ovário; G) Sutura do músculo abdominal; H) Sutura da pele.

Fonte: Yanagihara (2017)

3.4.2 Defeito ósseo

O procedimento de defeito ósseo foi realizado 90 dias após a retirada dos ovários dos animais. Para a realização do procedimento cirúrgico, primeiramente os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), aplicada via intramuscular na região glútea. Foi realizado tricotomia e assepsia da região medial das tíbias bilateralmente. Os animais foram mantidos em posição cirúrgica de supino, rotação externa e tríplice flexão do membro pélvico esquerdo. O terço proximal das tíbias foram mensuradas com uma régua e foi realizada uma incisão na pele e músculos de aproximadamente 1cm. A pele e os músculos foram afastados e posicionados com auxílio de um afastador (Figura 2).

Figura 2: Procedimento cirúrgico para execução do defeito ósseo.

A)- Mensuração da tíbia para localização do terço proximal; B) Posicionamento dos afastadores após secção da pele e músculos; C) Exposição da tíbia para irrigação com soro fisiológico e D) Defeito ósseo.

Fonte: Arquivo próprio.

O defeito ósseo foi realizado nas tíbias direita e esquerda por uma broca do tipo trefina de 2,0 mm de diâmetro interno (2,9mm de diâmetro externo) acoplado a um motor de baixa rotação (Micro Motor 210/105L, *Strong*®), como mostra a figura 3. Durante o procedimento foi realizado irrigação com soro fisiológico para evitar superaquecimento do local.

A musculatura foi suturada com fio absorvível 4.0 Vicryl® e a pele com fio não absorvível 4.0 Mononylon Ethilon®. Após o procedimento, os animais receberam uma dose de analgésico de Cetoprofeno (5 mg/Kg), via subcutânea, a cada 24h, durante dois dias. Todos os procedimentos foram realizados com materiais esterilizados.

Figura 3: Broca trefina acoplada ao Micro Motor 210/105L, Strong®.

Fonte: Arquivo próprio

3.5 Sedação

Para a execução do protocolo de EA, os animais foram mantidos com consciência, com redução das capacidades funcionais, afim de evitar a possibilidade de estresse pela imobilização durante os procedimentos de agulhamento, e para que as agulhas pudessem ficar adequadamente posicionadas durante o estímulo de EA.

Cada animal foi submetido à indução da sedação por meio de uma caixa indutora, na qual foi exposto ao anestésico inalatório isoflurano da marca Cristália (Itapira, São Paulo, Brasil) com concentração de 5% em oxigênio a 100%. Para isso, a caixa foi acoplada a um vaporizador calibrado de isoflurano para uso veterinário, contando também com um sistema de descarte de gás passivo, com um filtro de carvão ativado (Figura 4).

Figura 4: Sistema de sedação com anestésico inalatório

A) Vaporizador calibrado de isoflurano; B) Caixa indutora de anestesia; C) Filtro de carvão ativado para descarte de gás. Fonte: Arquivo próprio

Após os animais apresentarem sinais sedativos, os mesmos foram retirados do recipiente de indução e foram mantidos sob sedação através da inalação de isoflurano a 2% em oxigênio 100% com auxílio de máscaras adaptadas de tamanho e formato apropriados (Figura 5).

Figura 5: Manutenção do animal em sedação por meio de máscara adaptada.

Fonte: Arquivo próprio

3.6 Protocolo de eletroacupuntura

Os acupontos estimulados foram *Sanyinjiao* (BP6), localizado na borda posterior da tíbia, 0,5cm acima do maléolo medial e *Zusanli* (E36) localizado entre a tíbia e a fíbula aproximadamente 5mm lateral e abaixo do tubérculo anterior da tíbia (KIM, 2013; LENG et al., 2018). Antes de cada estímulo, foi realizada antissepsia com álcool 70% e então a puntura nos acupontos BP6 e E36 bilateralmente, com inserção perpendicular de 3-5 mm de profundidade, através de agulhas estéreis de acupuntura, Dizhou® (Wujiang City Medical and Health Material Co., China), com dimensões de 0,16 x 13 mm. Após a devida puntura dos animais, os cabos do aparelho de eletroestimulação foram conectados às extremidades das agulhas, seguindo protocolo sugerido por Fan et al (2016), utilizando os parâmetros de 2Hz de frequência, e intensidade de 1,0 mA, através do aparelho de eletroestimulação NKL-EL608 versão 3.3 (Brusque, Santa Catarina, Brasil). A terapia teve início 24h após a realização do procedimento de defeito ósseo, e ocorreu uma vez ao dia com duração de 20 minutos, durante 3 ciclos de 10 dias, com intervalo de 1 dia entre eles.

3.7 Eutanásia e coleta de materiais

Os animais foram submetidos à eutanásia por anestesia, utilizando doses excessivas de Xilazina e Ketamina (solução 1:1; 0,3ml/100g), que foram aplicadas via intraperitoneal. Posteriormente, foi coletado o sangue através de punção cardíaca e armazenado em Tubo *Falcon* contendo anticoagulante heparina, e em seguida foi centrifugado (Universal 320r, Hettich®, Tuttlingen, Alemanha) na rotação: 500xg, durante 10 minutos a 4°C. O plasma foi armazenado a - 20°C, para análise do hormônio folículo estimulante (FSH). Após a retirada do sangue, as tíbias direita e esquerda foram coletadas. O preparo e armazenamento dos materiais biológicos dependeram de cada análise a ser realizada.

3.8 Análise histológica

Após a dissecação, foi feita a fixação das propriedades dos ossos das tíbias esquerdas (n=6) de cada grupo, com imersão em formol 10% por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por 30 dias à temperatura ambiente, no qual a troca da solução foi realizada a cada 2 dias.

Após o período de descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente *overnight* e desidratadas em série crescente de álcool, de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada concentração, e em seguida, foram diafanizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo imersas por 1 hora em cada solução. Posteriormente, os ossos foram imersos em parafina I, II e III, para que fossem confeccionados os blocos, de modo que o defeito ósseo na face medial da tíbia ficasse exposto para o corte. Os cortes foram feitos utilizando o micrótomo rotativo manual HistoCore Biocut (Leica Biosystems®, Nussloch, Alemanha).

Os blocos foram seccionados em cortes longitudinais de 5 µm de espessura. Em cada tíbia, foram coletados cerca de 25 cortes semi-seriados, que percorreram toda a profundidade do defeito ósseo. Os fragmentos foram depositados em banho-maria com a temperatura da água em aproximadamente 38°C. Posteriormente, foram posicionados em lâminas de vidro silanizadas, e corados utilizando a técnica de Tricrômico de Masson, para análise da neoformação óssea em microscopia de luz.

Para análise das lâminas, foi utilizado o microscópio óptico modelo Axion Observer.A1 acoplado a uma câmera digital (Zeiss®). A aquisição das imagens foi realizada por meio do *software* Zenn 2.3 *blue edition* (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011) pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP).

Com auxílio do *software* NIS-Elements (Nikon®) foi possível quantificar a neoformação óssea, utilizando uma ferramenta de seleção manual para delimitar o ROI sobre o defeito ósseo (Figura 6).

Figura 6: Delimitação do ROI sobre o defeito ósseo

Fonte: Arquivo próprio

Posteriormente, foi demarcada a área do defeito ósseo correspondente a tecido ósseo neoformado (Figura 7-A), excluindo os elementos que não representassem osso (Figura 7-B), e posteriormente foi calculada a área correspondente.

Figura 7: Demonstração da área do defeito ósseo corado por meio de técnica de Tricômico de Masson.

A) Delimitação da área total de volume ósseo; B) Representação da área final, desprezando a região externa ao defeito ósseo.

Fonte: Arquivo próprio

A partir da área do ROI e área do ROI correspondente a tecido ósseo o *software* realizou o cálculo da porcentagem de área correspondente a tecido ósseo neoformado. A quantidade de osso foi expressa pela razão da área de osso pela área total do defeito ($B.Ar/Tt.Ar - \%$).

3.9 Microtomografia óssea (Micro-CT)

As tíbias direitas (n=6) foram inicialmente armazenadas em freezer -20°C e posteriormente, submetidas a 24 horas em solução de formol 10%, e então inseridas em álcool 70% para serem transportadas. Para a análise de Micro-CT utilizou-se o microtomógrafo SkyScan 1172 (*Bruker MicroCt Skyscan, Kontich, Bélgica*) pertencente ao Laboratório de Instrumentação Nuclear da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LIN-UFRJ, Rio de Janeiro). O quadro 1 mostra os parâmetros utilizados para a aquisição das imagens.

Quadro 1: Parâmetros utilizados para aquisição de imagens no microtomógrafo

<i>Pixel size</i>	15
<i>Voltage</i>	70 kV – 114 µA
<i>Rotation Step</i>	0,5°
<i>Random Movement</i>	30
<i>Frame averaging</i>	3

As reconstruções de imagens 3D foram feitas usando o software NRecon® (versão 1.6.9.8, *Bruker, Kontich, Bélgica*), que forneceu secções transversais axiais das estruturas internas das amostras, as quais foram realinhadas para melhor visualização do defeito ósseo por meio do software DataViewer (versão 1.0.5.2, *Bruker, Kontich, Bélgica*).

Foi delimitado um ROI de 3mm de diâmetro para selecionar a área do defeito ósseo para a análise quantitativa, por meio do software de análise CTAn (versão 1.14.4 *Bruker, Skyscan, Kontich, Bélgica*), no qual pode ser caracterizada a microarquitetura do osso trabecular das regiões de interesse pela determinação da fração de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N) e separação trabecular (Tb.Sp).

3.10 Densitometria óssea

A densitometria óssea foi realizada em um densitômetro de dupla emissão de raios-X, modelo Lunar DPX-IQ (GE Health Care, Little Chalfont, Reino Unido), com *software* de alta resolução DPX versão 4.7e especial para pequenas amostras, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Para a aquisição das imagens, as tíbias direitas foram posicionadas com a face medial voltada para cima, imersos em soro fisiológico com 2cm de profundidade em um recipiente plástico.

O comprimento do osso e o local do defeito ósseo foram mensurados utilizando um paquímetro, e por meio dessas medidas, foi feita uma transposição da escala real para a imagem escaneada pelo *software*, dessa forma foi possível definir o posicionamento da região de interesse (ROI) sobre o defeito ósseo (Figura 8), onde:

$$p2 = \frac{c1 \times p1}{c2}$$

c1: comprimento da tíbia em escala real;

p1: posição do defeito ósseo na escala real;

c2: comprimento da tíbia na imagem escaneada pelo densitômetro;

p2: posição do defeito ósseo na imagem escaneada pelo densitômetro.

O tamanho ROI foi definido em 0,60cm² e posicionado sobre a região correspondente ao defeito ósseo utilizando a ferramenta de seleção, para a coleta dos valores da DMO.

Figura 8: Esquema demonstrativo das medidas realizadas para o posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo

Fonte: arquivo próprio

3.11 Ensaio mecânico

As propriedades mecânicas de força máxima e rigidez relativa foram avaliadas por meio de ensaios mecânicos de baixa velocidade, utilizando uma Máquina Universal de Ensaios modelo DL10000, com o *software* TESC®, ambos da marca EMIC® (Espírito Santo dos Pinhais, Brasil), pertencentes ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. As tíbias foram incluídas pela extremidade distal em resina acrílica autopolimerizável, e então fixadas pela extremidade distal e apoiadas na região onde foi realizado o defeito ósseo com uma distância

de 15mm entre os dois pontos de apoio, e posicionadas com a face anterior do defeito voltadas para cima. O ensaio mecânico realizado foi o de flexão bi-apoiado (Figura 9), com aplicação de carga na velocidade de 5mm/min no sentido médio-lateral da tíbia. Foram utilizados uma célula de carga de 500N, uma pré-carga de 5N e o tempo de acomodação de 30 segundos.

Figura 9: Tíbia direita posicionada nos aparatos da máquina universal de ensaios para realização do ensaio mecânico de flexão bi-apoiado

Fonte: arquivo próprio

3.12 Expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR)

Os ossos das tíbias esquerdas destinados para essa análise (n=5) foram manipulados com materiais livres de RNases e esterilizados. Também foi utilizado reagente de limpeza em spray para remover qualquer resíduo de RNase (RNaseZAP™, *Sigma Aldrich*) nos locais de manipulação. Os ossos foram cortados imediatamente após a dissecação, na região do defeito ósseo, em um formato quadrangular de aproximadamente 3mm, utilizando um motor de baixa rotação (Micro Motor 210/105L, *Strong®*). Os cortes foram armazenados em tubos *eppendorfs* de 2,0ml livres de RNases contendo uma solução inativadora de RNase, para estabilizar e proteger o RNA (RNAlater®, *Sigma Aldrich*), em seguida, armazenados em freezer -80°C.

A análise de PCR em tempo real foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e de Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP (FORP/USP).

A metodologia da análise seguiu a seguinte ordem:

a) Extração e quantificação do RNA: As amostras foram trituradas manualmente com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido e homogeneizadas com reagente Trizol® (*Life Technologies*), seguindo as instruções do fabricante, para extração dos RNAs. Posteriormente o RNA total foi quantificado por espectrofotometria (*NanoDrop™ OneC, Thermo Fisher Scientific, USA*), utilizando comprimento de onda 260nm.

b) Sintetização de DNA complementar (cDNA): O cDNA foi sintetizado com 1µg de RNA em um volume total de 20µL utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

c) Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA): A quantificação do mRNA foi feita utilizando SYBR® *Green*, em um sistema termociclador e de detecção (*Step One Plus* – Applied Biosystems, USA). Para a análise de cada gene, foi utilizada uma placa de 96 poços. Foi utilizado o *gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase* (GAPDH), como controle endógeno. Os seguintes genes foram avaliados: RANKL, OC e MMP-9 e a sequência dos iniciadores está demonstrada na tabela 2. Foi realizado teste de eficiência de amplificação para cada um dos iniciadores seguindo as recomendações do fabricante, sendo que foram utilizadas concentrações fixas dos iniciadores: 50, 300 e 900nM e diluições seriadas de cada um dos cDNAs, em duplicata, no qual a eficiência foi determinada a partir dos valores de *slope* da curva padrão, sendo aceito valores entre: -3,1 e -3,6. De acordo com o teste de eficiência, foram escolhidas as concentrações de 300nM para OC e RANKL, e 900nM para MMP-9.

Tabela 2: Sequência de iniciadores utilizados

Iniciadores	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
GAPDH	TGATGGGTGTGAACACGAG	CCCTTCCACGATGCCAAAGT
OC	CATGAGGACCCTCTCTCTGC	ATAGATGCGCTTGTAGGCGT
RANKL	TGGAAGGCTCATGGTTGGAT	CATTGATGGTGAGGTGTGCA
MMP-9	AGCCGGGAACGTATCTGGA	TGGAAACTCACACGCCAGAAG

d) Cálculo da expressão relativa do gene. A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$. O valor foi utilizado na equação $2^{\Delta\Delta C_t}$, no qual o resultado representa a expressão relativa de mRNA expressa em unidades arbitrárias.

3.13 Análise do Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

A concentração plasmática do FSH foi determinada para confirmar o sucesso no procedimento da cirurgia de ovariectomia. A análise foi realizada no Departamento de Fisiologia da FMRP/USP, por meio de análise bioquímica, utilizando o método de radioimunoensaio de duplo anticorpo, utilizando anticorpo específico para FSH e hormônio padrão de referência, ambos obtidos pelo *National Hormone and Peptide Program* (Harbor-UCLA Medical Center, EUA).

3.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS (versão 20.0, IBM®, Armonk, EUA). Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Levene para verificar se o comportamento dos dados foi ou não paramétrico. Para dados paramétricos, utilizou-se o teste de variância ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey para a comparação entre os grupos experimentais.

Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%. As tabelas estatísticas são apresentadas no Apêndice A.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise de FSH

A concentração plasmática de FSH foi determinada para confirmar a eficácia da cirurgia OVX, sendo que o hormônio FSH tem um papel importante na maturação folicular e na manutenção da produção de estrógeno pelas células da granulosa. A eficácia do procedimento foi confirmada, no qual os grupos submetidos a ovariectomia apresentaram valores significativos estatisticamente maiores ($p < 0,001$), como pode ser observado na figura 10.

Figura 10: Concentração de FSH nos grupos experimentais

4.2 Massa corporal

A massa corporal dos animais foi avaliada durante o período de 20 semanas, e apresentou distribuição normal entre os grupos na 1ª semana ($p = 0,038$), como pode ser observado na figura 11. A cirurgia de ovariectomia teve influência sobre a massa corporal dos animais dos grupos OVXDOA e OVXDO, os quais não tiveram diferença estatística significativa entre si, mas apresentaram valores maiores em relação aos grupos SDOA e SDO, com diferença estatística entre eles após 90 dias do procedimento de ovariectomia, representada entre a 13ª e 14ª semanas. Por meio do teste ANOVA *one-way* foi observado diferença entre os grupos ($p = 0,001$), e após o teste post-hoc de Tukey para a comparação entre os grupos experimentais, $OVXDOA > SDOA$ ($p = 0,001$); $OVXDOA > SDO$ ($p = 0,001$); $OVXDO > SDOA$ ($p = 0,001$) e $OVXDO > SDO$ ($p = 0,001$). Podemos observar no gráfico representado na figura 11 o crescimento progressivo dos animais no decorrer de 125 dias do experimento. Entre as

semanas 13 e 14 houve uma queda nos valores da massa corporal em todos os grupos, que pode ter sido influenciado pelo procedimento de defeito ósseo.

Figura 11: Massa Corporal dos animais a cada semana de experimento

4.3 Micro-CT

Para verificar a eficácia do tratamento com EA no processo de regeneração óssea na região do defeito ósseo, foram realizadas análises de microtomografia óssea, que analisa a qualidade e quantidade do tecido ósseo por meio de análises de graus de cinza (*threshold*). A partir dos resultados, foram observadas alterações da estrutura após a intervenção com EA para BV/TV, no qual o grupo OVXDO apresentou valores inferiores em relação aos demais grupos, sendo estatisticamente diferente dos grupos OVXDOA ($p=0,003$), SDOA ($p=0,001$) e SDO ($p=0,001$). Os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tb.Th ($p=0,223$); Tb.N ($p=0,930$); Tb.Sp. ($p=0,746$)). A figura 12 representa as imagens em plano transversal de amostras de cada grupo experimental, onde é possível observar qualitativamente a diferença de espessura do osso cortical na região do defeito ósseo. A figura 13 apresenta os resultados obtidos por meio da análise por Micro-CT.

Figura 12: Imagens da microarquitetura da região do defeito ósseo de tíbias no plano transversal

A)- amostra do grupo OVXDOA; B)- amostra do grupo OVXDO; C)- amostra do grupo SDOA; D)- amostra do grupo SDO. As setas indicam a região analisada do defeito ósseo.

Figura 13: Resultados obtidos por meio da análise de Micro-CT dos grupos experimentais

A) Resultados da fração de volume ósseo (ab - letras iguais indicam semelhança estatística – $p > 0,05$); B) Resultados da espessura trabecular; C) Resultados do número de trabéculas e D) Resultados da separação trabecular.

4.4 DMO

Além da análise de micro-CT, foi realizada também a análise densitométrica da área do defeito ósseo das tíbias, na qual foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0,001$), onde o grupo OVXDOA demonstrou valores de DMO aproximados aos dos grupos SHAM, e o grupo OVXDO apresentou valores menores em relação aos demais grupos (OVXDOA > OVXDO ($p=0,001$); SDOA > OVXDO ($p=0,001$); SDO > OVXDO ($p=0,001$)). Entre os grupos SHAM, não houve diferença entre si. Os resultados estão apresentados na figura 14.

Figura 14: Resultados da análise de densidade mineral óssea

(ab - letras iguais indicam semelhança estatística – $p > 0,05$)

4.5 Força máxima e rigidez relativa

As propriedades mecânicas dos ossos das tíbias de todos os grupos experimentais foram avaliadas quanto a força máxima e rigidez relativa. Em nossas análises, ao comparar o efeito das variáveis ao ensaio mecânico de flexão bi-apoiado, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos experimentais na força máxima ($p=0,108$) e rigidez relativa ($p=0,080$). Os resultados estão demonstrados na figura 15.

Figura 15: Resultados obtidos por meio do ensaio mecânico

A) Resultados de força máxima; B) Resultados de rigidez relativa

4.6 Quantificação de neoformação óssea

Os cortes histológicos contendo a região do defeito ósseo dos grupos experimentais foram submetidos a coloração com Tricômio de Masson, de forma a observar o processo de neoformação óssea. A quantificação da microarquitetura óssea foi realizada na região do defeito ósseo das tíbias, com o auxílio do software NIS-Elements (Nikon®), o qual possui a propriedade de mensuração da área óssea em micrometros quadrado (μm^2), sendo os valores armazenados em porcentagem de área óssea pelo reconhecimento dos tons de azul correspondentes ao tecido ósseo, evidenciado pela coloração utilizada.

A figura 16 mostra imagens adquiridas por meio da fotomicrografia dos defeitos ósseos das tíbias dos grupos experimentais coradas com Tricômio de Masson. Qualitativamente, a amostra do grupo OVXDO (figura 16B) apresenta menor área de osso (representado pela cor azul) quando comparado aos demais grupos. Após análise estatística, os resultados obtidos por meio da análise histológica apresentaram diferença significativa para o grupo OVXDO, o qual obteve valores inferiores de área de osso quando comparados aos demais grupos experimentais, onde $\text{OVXDOA} > \text{OVXDO}$ ($p=0,001$); $\text{SDOA} > \text{OVXDO}$ ($p=0,001$) e $\text{SDO} > \text{OVXDO}$ ($p=0,001$). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre si. Os valores estão demonstrados na figura 17.

Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito ósseo.

A)- Amostra do grupo OVXDOA; B)- Amostra do grupo OVXDO; C)- Amostra do grupo SDOA; D)- Amostra do grupo SDO.

Figura 17: Resultados da análise quantitativa de área de osso

(ab - letras iguais indicam semelhança estatística – $p > 0,05$)

4.7 qRT-PCR

Afim de verificar a expressão de genes envolvidos no processo de regeneração óssea, foram analisados os genes MMP-9, RANKL e OC por meio da análise de qRT-PCR, no qual

não foi observado diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos para a expressão relativa dos genes MMP-9 ($p=0,757$); RANKL ($p=0,109$) e OC ($p=0,677$), porém, pode-se observar na figura 18 que os grupos tratados OVXDOA e SDOA apresentaram uma maior expressão relativa dos genes OC e RANKL em comparação aos grupos não tratados OVXDO e SDO, da mesma forma que os grupos não tratados apresentaram valor maior na expressão relativa de MMP-9 em relação aos grupos tratados, sugerindo efeito benéfico do tratamento com EA na formação óssea.

Figura 18: Expressão relativa dos genes dos grupos experimentais

A)– Resultado da expressão relativa de MMP-9; B)– Resultado da expressão relativa de RANKL;
C)– Resultado da expressão relativa de OC.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do protocolo de EA na regeneração de defeito ósseo em tíbias de ratas da linhagem *Sprague-Dawley* com osteopenia induzida pelo procedimento de ovariectomia.

A medicina ocidental vem buscando medidas efetivas para melhorar a qualidade do tecido ósseo em pacientes com osteopenia/osteoporose, porém as opções de tratamento medicamentoso existentes são ainda limitadas e controversas. Sabe-se que, embora a terapia de reposição estrogênica seja eficaz, ela pode aumentar o risco de câncer de mama e ter efeitos colaterais negativos inevitáveis. Outro exemplo que também apresenta efeitos positivos sobre a neoformação óssea é a terapia com o fármaco da classe dos bifosfonatos. No entanto, a utilização a longo prazo pode levar ao aumento do risco de fraturas por fadiga e fraturas intertrocantericas (KAWAI et al., 2011). Em meio a esses achados, a acupuntura vem sendo uma alternativa terapêutica eficaz para a osteoporose, possuindo fácil aplicação e baixo custo.

De acordo com Zhang (2004), a acupuntura possui três ações terapêuticas: ação proximal, que significa que os pontos são eficazes para afecções próximas a sua localização; ação distal, que se refere a efeitos sistêmicos, podendo estar localizados distantes dos pontos, baseados na teoria de canais e colaterais; e ação específica, que se refere a efeitos específicos de pontos em determinados órgãos e vísceras. Segundo a teoria da MTC, a osteopenia e osteoporose são causadas por uma deficiência do Qi do rim. O rim é um órgão que armazena essências vitais, que se originam de nutrientes refinados fornecidos pelo baço ou estômago e formam a medula que nutre os ossos. Sendo assim, "o rim domina os ossos", o que permite o entendimento sobre a existência de uma relação íntima entre ossos e órgãos como o rim, o baço e o estômago (ZHANG et al., 2004).

Com base nos relatos da literatura, foram utilizados em nosso estudo os acupontos *Sanyinjiao* (BP6) e *Zusanli* (E36), uma vez que estão localizados próximo à tíbia, e além disso, têm o objetivo de tonificar o baço e o estômago e acelerar a absorção gastrointestinal para melhorar a energia genuína enfraquecida e a osteoporose devido a ovariectomia (PAN et al., 2018). Os estímulos ocorreram entre 9h e 11h da manhã, durante 3 ciclos de 10 dias, com 1 dia de intervalo entre os ciclos, como proposto por Fan et al (2016), seguindo os parâmetros de estimulação elétrica por 20 minutos com frequência de 2 Hz, e 1,0 mA de intensidade (FAN et al., 2016). A corrente elétrica estimula ações potenciais causando uma reação em cadeia de processos químicos no corpo. A EA de baixa frequência aumenta o fluxo sanguíneo para os locais da agulha, iniciando a resposta da histamina e um aumento de mastócitos para promover

os mecanismos de regeneração do corpo (OLSON et al., 2014). Contudo, os acupontos a serem estimulados, bem como o tempo do estímulo e o período de tratamento a serem utilizados para a osteoporose pós-menopausa ainda não estão totalmente nítidos.

Para pesquisas em laboratórios, um dos principais modelos utilizados nos estudos são os ratos, especialmente nas pesquisas envolvendo a patogênese sobre osteopenia e osteoporose, uma vez que podem ser facilmente controlados, além de proporcionarem resultados em um curto período de tempo (MARTIN; RITMAN; TURNER, 2003). O modelo de osteopenia com ratas ovariectomizadas foi primeiramente estabelecido por Saville em 1969, e vem sendo amplamente utilizado desde então como um modelo clássico para promover a redução da produção de estrogênio endógeno pelos ovários (JEE; YAO, 2001; SAVILLE, 1969).

Em nosso estudo, o procedimento de defeito ósseo foi realizado após 90 dias da ovariectomia, sendo que Jee e Yao (2001) afirmaram em revisão de literatura que a extensão da redução da massa óssea depende do sítio e do tempo pós-ovariectomia, na qual uma redução significativa da metáfise proximal da tíbia, vértebras lombares e colo femoral se torna perceptível após 90 dias desde a ovariectomia (JEE; YAO, 2001). O protocolo de tratamento com EA em nosso estudo teve início 24h após o procedimento de defeito ósseo, assim, seria possível avaliar os efeitos da EA frente a um tecido ósseo com osteopenia.

O efeito da cirurgia de ovariectomia nos grupos experimentais foi confirmado pelo aumento da concentração plasmática de FSH, o que é justificado pela deficiência de estrogênio no organismo, uma vez que esse hormônio causa um aumento expressivo de FSH. O estrogênio desempenha um papel importante no metabolismo ósseo, e sua deficiência após ovariectomia causa uma diminuição significativa na apoptose dos osteoclastos, o que por sua vez, promove a reabsorção óssea (CAO; GREGOIRE, 2016; MACEDO et al., 2017). A perda óssea está associada à alta taxa de reabsorção óssea, com aumento do número tanto de osteoclastos, como de osteoblastos. A maior alteração na remodelação óssea ocorre após a menopausa, momento em que os níveis de estrogênio estão reduzidos. Embora o número de osteoblastos também esteja elevado devido a associação da absorção e reabsorção óssea, o aumento de formação óssea ainda é insuficiente para substituir a matriz óssea reabsorvida pelos osteoclastos (RIGGS; KHOSLA; MELTON, 1998).

Outra particularidade presente após o procedimento de ovariectomia é o aumento do peso, que ocorre pela influência de hormônios ovarianos nos processos regulatórios de ingestão de alimentos. Níveis plasmáticos elevados de estradiol durante o período pré-ovulatório estão associados à redução transitória da alimentação, além da redução da porção de alimento

ingerido, portanto, a retirada dos ovários está relacionada com a redução do nível de estradiol, o que promove aumento da ingestão de alimento e consequente aumento da adiposidade e rápido ganho de peso (ASARIAN; GEARY, 2002; ECKEL, 1999; JOHNSTON; WARD, 2015). Corroborando com esses achados, nosso estudo demonstrou que os grupos ovariectomizados apresentaram maior ganho de massa corporal em relação aos demais grupos.

A utilização da terapia por EA para o tratamento da osteoporose tem apresentado alguns resultados benéficos que vão desde a melhora do quadro de DMO, ao aperfeiçoamento da propriedade mecânica do fêmur (ZHANG et al., 2006) e preservação da arquitetura óssea, em espessura e volume trabecular da tíbia, como descrito em um estudo com camundongos SAMP6, um modelo de osteoporose senil. (ZHANG et al., 2009). O tratamento com acupuntura pode aumentar a DMO, o nível sérico de cálcio e estradiol, o que pode reduzir a perda óssea em pacientes com osteoporose (YAN et al., 2018).

Em nosso estudo, foi possível observar um valor significativamente menor da DMO na região do defeito ósseo em amostras do grupo OVXDO em relação aos demais grupos. Zhou et al (2012, 2014) apontaram uma melhora significativa no quadro de DMO de ratas osteopênicas após a aplicação da EA nos acupontos BP6 e E36, e corroborando com esses achados, Zhang et al (2004) sugeriram que tanto o protocolo de acupuntura em B20 e B23 como em E36 e BP6 houve tendência de melhora da DMO em vértebras lombares de ratas. Diante desses achados e considerando que o nível de DMO pode refletir o risco de fratura em pacientes com osteoporose (SILVA; BORBA; KANIS, 2017), a terapia com acupuntura pode reduzir o risco de fratura, além de melhorar a densidade do tecido ósseo neoformado e a qualidade de vida de indivíduos com osteoporose.

Além da DMO, a EA promove também o aperfeiçoamento da estrutura óssea (ZHOU et al., 2012, 2014). Nossos achados para a microarquitetura obtidos por meio do micro-CT apontam que o grupo OVXDO apresentou menor volume de osso neoformado na região do defeito ósseo, com redução significativa para BV/TV em relação aos demais grupos. Tais achados estão de acordo com outros estudos que também observaram redução significativa deste parâmetro após a ovariectomia, devido ao aumento da taxa de reabsorção óssea (ZHAO; LIU; ZHANG, 2013). O grupo OVXDOA apresentou valores para BV/TV similares aos grupos não ovariectomizados, o que sugere que o tratamento com EA teve influência no processo regenerativo de defeito ósseo nas tíbias osteopênicas.

Levando em consideração que a regeneração óssea completa em ratos ocorre entre 5 e 8 semanas (MARSELL; EINHORN, 2011), Histing et al (2011) sugerem que a análise da fase

inicial da regeneração óssea seja realizada nas primeiras duas semanas, enquanto para avaliar a fase final do reparo é mais apropriado o tempo de quatro a seis semanas (HISTING et al., 2011). Em nosso estudo, as análises foram realizadas após 35 dias a partir da cirurgia de defeito ósseo, e confirmando a diferença apresentada pela análise densitométrica e de micro-CT, a área de osso quantificada pela análise histológica apontou maior quantidade de área de osso neoformado no grupo OVXDOA em relação ao grupo OVXDO. Outros estudos também apontam melhora significativa da área de osso em análise histológica de amostras de tíbias de ratas osteopênicas após tratamento com EA (ZHENG et al., 2018), corroborando com nossos achados. Os grupos com cirurgia SHAM não tiveram diferença estatística entre si, embora apontem uma tendência, no qual o grupo tratado apresentou valores maiores para os parâmetros analisados, o que sugere que o protocolo utilizado em nosso estudo apresenta maior influência para o tratamento da osteopenia e osteoporose, como afirmado por outros autores (PAN et al., 2018).

Embora nossos achados tenham evidenciado melhora na regeneração do defeito ósseo do grupo tratado com EA quando comparado com o grupo não tratado, os dados obtidos por meio da análise das propriedades mecânicas não apresentaram diferença significativa. O defeito ósseo foi realizado na metáfise proximal das tíbias, levando em consideração que a perda óssea se torna progressiva a partir de 14 dias após a ovariectomia, chegando a ser considerado osteopênico após 90 dias (JEE; YAO, 2001). O modelo de ensaio mecânico de flexão bi-apoiado utilizou uma aplicação de carga na velocidade de 5mm/min no sentido médio-lateral, na extremidade proximal da tíbia, para que atingisse a região do defeito ósseo. Considerando o tempo e as fases de maturação do osso supracitados, sugere-se que, apesar da quantidade de tecido ósseo neoformado ter sido maior nos grupos tratados, o período de 35 dias não foi suficiente para evidenciar uma melhora significativa na força máxima e rigidez relativa das amostras analisadas.

O processo da regeneração óssea envolve muitos fatores, como um aporte vascular adequado para formação do coágulo sanguíneo e a ação conjunta e coordenada de células ósseas, relacionadas à fatores de inflamação ósseos. Em nosso estudo, foram analisados 3 genes envolvidos no processo de regeneração óssea por meio do qRT-PCR, sendo eles o RANKL, que é um fator importante para a osteoclastogênese, expresso por osteoblastos e células do estroma, quando ligado ao receptor RANK em precursores de osteoclastos, induz a formação de osteoclastos (CROCKETT et al., 2011); MMP-9 que também é considerado um importante biomarcador envolvido na reabsorção óssea (ZHENG et al., 2018); e OC, um importante

marcador de osteoblastos maduros e que está envolvido na fase final do reparo ósseo (ANDRADE et al., 2007). Embora nossos resultados não tenham apresentado diferença significativa na expressão relativa desses genes, pode-se observar uma tendência de melhora na expressão de OC e RANKL quando comparado os grupos tratados (OVXDOA e SDOA) com os grupos não tratados (OVXDO e SDO), da mesma forma que para a expressão de MMP-9, se mostra superior nos grupos não tratados em relação aos grupos que receberam tratamento com EA, o que era esperado, uma vez que estudos realizados em animais com osteopenia induzida por ovariectomia apontam que a MMP-9 desempenha um papel importante na progressão da perda óssea no processo de osteoporose (ZHAO et al., 1997). Porém, nossos resultados tornaram-se limitados frente à quantidade de amostras utilizadas (n=3–5). Além disso, deve-se considerar que a OC está envolvida no processo final da maturação óssea. Os resultados obtidos sugerem que a quantidade de amostras e o período avaliado não foram suficientes para alterar de forma significativa a expressão desses genes.

Embora descrito na literatura sobre os efeitos benéficos da EA em várias patologias, inclusive no osso, os mecanismos de atuação da EA sobre o osso osteopênico ainda não foram totalmente elucidados. Alguns estudos apontam que esta intervenção atuaria por meio do estímulo da formação óssea, outros pelo aumento da atividade de dopamina e norpinefrina hipotalâmica, e assim influenciando positivamente a qualidade óssea tanto em camundongos fêmeas como machos (ZHANG et al., 2009); outros autores apontam ainda a influência da EA sobre o aumento da expressão de LRP5 e β -catenina, sendo que a ativação destas vias de sinalização promovem a proliferação e diferenciação de precursores de osteoblastos (ZHOU et al., 2012). Portanto, nossos achados apontam a necessidade de analisar maior número de amostras para melhor ponderar os efeitos da EA na expressão destes genes em específico, além da análise de outras vias de expressão e sinalização envolvidas no processo de formação óssea, para que dessa forma seja possível futuramente caracterizar e ou determinar um possível mecanismo de regulação envolvido no processo de regeneração óssea nesses modelos animais.

De maneira geral, nossos achados apontam que a EA nos acupontos E36 e BP6 após a instalação do quadro de osteopenia em ratas ovariectomizadas apresentou influência positiva sobre a regeneração de defeito ósseo em tíbias osteopênicas, promovendo melhora do quadro de DMO. Além disso, a EA parece influenciar na melhora da qualidade do osso osteopênico, principalmente na formação de osso cortical. Entretanto, ainda existem divergências na literatura quanto alguns achados para a expressão gênica, propriedades mecânicas e análises

morfométricas, tornando-se necessário observar a discrepância entre protocolos utilizados, o tempo e o período de intervenção e, inclusive o modelo animal utilizado.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Nossos achados apontam que a EA nos acupontos E36 e BP6 em ratas *Sprague-Dawley* ovariectomizadas apresentou influência positiva sobre a regeneração de defeito ósseo, promovendo melhora do quadro de DMO e microarquitetura óssea.

Com base em nossos achados, conclui-se, portanto, que o uso da EA apresentou uma influência benéfica sobre o processo de regeneração óssea, principalmente quanto a qualidade óssea utilizando esse modelo animal de defeito ósseo em tíbias osteopênicas.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, T. L. et al. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. **Bone**, v. 35, n. 5, p. 1107–1119, 1 nov. 2004.
- ANDERSSON, S.; LUNDEBERG, T. Acupuncture — from empiricism to science: Functional background to acupuncture effects in pain and disease Pain and disease. **Medical Hypotheses**, v. 45, n. 3, p. 271–281, set. 1995.
- ANDRADE, A. D. A. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **ImplantNews**, p. 659–662, 2007.
- ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Hormones and Behavior**, v. 42, n. 4, p. 461–471, 2002.
- AUGAT, P.; CLAES, L.; ECKERT-H, K. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, n. 5, p. 1099–1105, 2002.
- BECKER, R. O. et al. Electrophysiological correlates of acupuncture points and meridians. **Psychoenergetic Systems**, v. 1, n. 106, p. 195–212, 1976.
- BEZERRA, M. C. et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 38, n. 2, p. 161–70, fev. 2005.
- BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. SPECIAL TOPIC Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. v. 129, p. 1314, 2012.
- BURGE, R. et al. Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 3, p. 465–475, 1 mar. 2007.
- CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. **Nutrition Research**, v. 36, n. 4, p. 320–327, 2016.
- CHEW, P.; KEE, M. B. **ACUPUNCTURE-AN ANCIENT CHINESE ART OF HEALING**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://smj.sma.org.sg/0404/0404smj4.pdf>>. Acesso em: 5 maio. 2019.
- CHON, T. Y.; LEE, M. C. Acupuncture. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, n. 10, p. 1141–1146, 2013.
- CLARK, P. et al. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). **Osteoporosis International**, v. 20, n. 2, p. 275–282, 26 fev. 2009.
- CLEMENT-JONES, V. et al. INCREASED β -ENDORPHIN BUT NOT MET-ENKEPHALIN LEVELS IN HUMAN CEREBROSPINAL FLUID AFTER ACUPUNCTURE FOR RECURRENT PAIN. **The Lancet**, v. 316, n. 8201, p. 946–949, 1 nov. 1980.

- COSTA, A. L. D. et al. Osteoporose na atenção primária: uma oportunidade para abordar os fatores de risco. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 111–116, 1 mar. 2016.
- CROCKETT, J. C. et al. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 1, p. 1–20, 11 jan. 2011.
- D'AMELIO, P.; ISAIA, G.; ISAIA, G. C. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. **Journal of endocrinological investigation**, v. 32, n. 4 Suppl, p. 6–9, 2009.
- DOWNEY, P. A.; SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. **Physical Therapy**, v. 86, n. 1, p. 77–91, 2006.
- ECKEL, L. A. Ingestive behaviour in female rats: influence of the ovarian cycle. **Appetite**, v. 32, n. 2, p. 274, 1999.
- EGERMANN, M.; GOLDHAHN, A. J.; SCHNEIDER, A. E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. 2005.
- FAN, H. et al. Electroacupuncture stimulation at CV4 prevents ovariectomy-induced osteoporosis in rats via Wnt- β -catenin signaling. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 3, p. 2485–91, mar. 2016.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed research international**, v. 2015, p. 421746, 2015.
- GIBON, E.; LU, L.; GOODMAN, S. B. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 44, 2016.
- HISTING, T. et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. **Bone**, v. 49, n. 4, p. 591–599, 2011.
- HUGHES, D. E. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . **Nature medicine**, v. 2, n. 10, p. 1132–6, out. 1996.
- JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 3, p. 193–207, mar. 2001.
- JOHNSON, C. **Acupuncture works on endorphins** > **News in Science (ABC Science)**. Disponível em: <<http://www.abc.net.au/science/articles/1999/06/04/27924.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- JOHNSTON, B. D.; WARD, W. E. **The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women** **BioMed Research International** Hindawi Publishing Corporation, , 2015.
- KAWAI, M. et al. **Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration** **Nature Reviews Drug Discovery**, fev. 2011.
- KIM, C. **Atlas de Acupuntura Veterinária: Cão e Gato**. Editora Ro ed. [s.l: s.n.].
- KLEIN-NULEND, J. et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. **Journal of Biomechanics**, v. 48, p. 855–865, 2015.
- KU, Y. H.; CHANG, Y. Z. β -Endorphin- and GABA-mediated depressor effect of specific electroacupuncture surpasses pressor response of emotional circuit. **Peptides**, v. 22, n. 9, p.

1465–1470, 2001.

LASH, R. W. et al. Diagnosis and Management of Osteoporosis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 1, p. 181–198, 1 mar. 2009.

LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative medicine**, v. 58, n. 5, p. 424–30, out. 2008.

LENG, J. et al. Electroacupuncture Reduces Weight in Diet-Induced Obese Rats via Hypothalamic Tsc1 Promoter Demethylation and Inhibition of the Activity of mTORC1 Signaling Pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

LIN, J.-G.; CHEN, W.-L. Acupuncture Analgesia: A Review of Its Mechanisms of Actions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 36, n. 04, p. 635–645, 5 jan. 2008.

LOI, F. et al. Inflammation, Fracture and Bone Repair. **Bone**, v. May, n. 86, p. 119–130, 2016.

MACEDO, A. P. et al. Influence of treadmill training on bone structure under osteometabolic alteration in rats subjected to high-fat diet. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 27, n. 2, p. 167–176, 1 fev. 2017.

Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of the north American menopause society. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 17, n. 1, p. 25–54, 2010.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 115–37, abr. 2000.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551–5, jun. 2011.

MARTIN, E. A.; RITMAN, E. L.; TURNER, R. T. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. **Bone**, v. 32, n. 3, p. 261–7, mar. 2003.

NARANJO, A. et al. Management of osteoporosis in primary care before and after the result of densitometry: treatments in real practice versus the recommended by guidelines. CANAL study. **Reumatologia clinica**, v. 9, n. 5, p. 269–73, set. 2013.

NELSON, D. A.; MOLLOY, R.; KLEEREKOPER, M. Prevalence of osteoporosis in women referred for bone density testing: utility of multiple skeletal sites. **Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry**, v. 1, n. 1, p. 5–11, 1998.

NICOLETTI, M. et al. Impact of neuropeptide substance P an inflammatory compound on arachidonic acid compound generation. **INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY**, v. 25, n. 4, p. 849–857, 2012.

NYMAN, J. S. et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1252–60, jun. 2011.

OLSON, R. et al. **THE EFFECTS OF ACUPUNCTURE ON BONE MASS DENSITY**

AND THE BIOCHEMICAL MECHANISMS BEHIND IT: A RESEARCH SYNTHESIS The Effects of Acupuncture on Bone Mass Density and the Biochemical Mechanisms Behind It: A Research Synthesis A Capstone Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Acupuncture and Oriental Medicine. [s.l: s.n.].

PAN, H. et al. The Effectiveness of Acupuncture for Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 46, n. 3, p. 1–25, 2018a.

PAN, H. et al. The Effectiveness of Acupuncture for Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 46, n. 3, p. 489–513, 2018b.

PARK, S. B.; LEE, Y. J.; CHUNG, C. K. Bone Mineral Density Changes after Ovariectomy in Rats as an Osteopenic Model : Stepwise Description of Double Dorso-Lateral Approach. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 48, n. 4, p. 309, out. 2010.

PÉREZ EDO, L. et al. [2011 Up-date of the consensus statement of the Spanish Society of Rheumatology on osteoporosis]. **Reumatologia clinica**, v. 7, n. 6, p. 357–79, nov. 2011.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 12, p. 3318–25, dez. 2005.

RALSTON, S. H.; FRASER, J. Diagnosis and management of osteoporosis. **The Practitioner**, v. 259, n. 1788, p. 15–9, 2, dez. 2015.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 763–73, 1 maio 1998.

SAVILLE, P. D. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 17, n. 2, p. 155–66, fev. 1969.

SILVA, D. M. W.; BORBA, V. Z. C.; KANIS, J. A. Evaluation of clinical risk factors for osteoporosis and applicability of the FRAX tool in Joinville City, Southern Brazil. **Archives of Osteoporosis**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2017.

SIMS, N. A.; MARTIN, T. J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. **BoneKEY reports**, v. 3, p. 481, 8 jan. 2014.

STAGI, S. et al. Bone metabolism in children and adolescents: main characteristics of the determinants of peak bone mass. **Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 3, p. 172–9, set. 2013.

SZULC, P. Bone turnover: Biology and assessment tools. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 725–738, 1 out. 2018.

TANNENBAUM, C. et al. Yield of Laboratory Testing to Identify Secondary Contributors to Osteoporosis in Otherwise Healthy Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4431–4437, 1 out. 2002.

TU, K. N. et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 43, n. 2, p. 92–104, fev. 2018.

YAN, D. D. et al. Association of serum uric acid levels with osteoporosis and bone turnover markers in a Chinese population. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 4, p. 626–632, 2018.

YANAGIHARA, G. R. Análise tecidual e biomecânica de ossos de ratas ovariectomizadas alimentadas com ração hiperlipídica. 2017.

YANO, T. et al. Alterations in the Function of Cerebral Dopaminergic and Serotonergic Systems Following Electroacupuncture and Moxibustion Applications: Possible Correlates with Their Antistress and Psychosomatic Actions. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 1, p. 283–293, jan. 2004.

ZHANG, W. et al. Preventive and therapeutic effects of acupuncture on bone mass in osteopenic ovariectomized rats. **The American journal of Chinese medicine**, v. 32, n. 3, p. 427–43, jan. 2004.

ZHANG, W. et al. Acupuncture increases bone strength by improving mass and structure in established osteoporosis after ovariectomy in rats. **Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan**, v. 26, n. 2, p. 138–47, jun. 2006.

ZHANG, X. et al. Changes in histomorphometric and mechanical properties of femurs induced by acupuncture at the Shenshu point in the SAMP6 mouse model of senile osteoporosis. **Gerontology**, v. 55, n. 3, p. 322–32, 2009.

ZHANG, Y. et al. Systemic Injection of Substance P Promotes Murine Calvarial Repair Through Mobilizing Endogenous Mesenchymal Stem Cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 12996, 29 ago. 2018.

ZHAO, H. et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in osteoporotic bone tissues. **Journal of Tongji Medical University = Tong ji yi ke da xue xue bao**, v. 17, n. 1, p. 28–31, 1997.

ZHAO, Q.; LIU, X.; ZHANG, L. Bone Selective Protective Effect of a Novel Bone-seeking Estrogen on Trabecular Bone in Ovariectomized Rats. p. 172–183, 2013.

ZHENG, X. et al. Long-term electroacupuncture stimulation prevents osteoporosis in ovariectomised osteopaenic rats through multiple signalling pathways. **Acupuncture in medicine : journal of the British Medical Acupuncture Society**, v. 36, n. 3, p. 176–182, 1 jun. 2018a.

ZHENG, X. et al. Dynamic expression of matrix metalloproteinases 2, 9 and 13 in ovariectomy-induced osteoporosis rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 3, p. 1807–1813, set. 2018b.

ZHOU, J. et al. Electroacupuncture prevents ovariectomy-induced osteoporosis in rats: a randomised controlled trial. **Acupuncture in medicine : journal of the British Medical Acupuncture Society**, v. 30, n. 1, p. 37–43, 28 mar. 2012.

ZHOU, J. et al. Effects of electroacupuncture on bone mass and cathepsin K expression in ovariectomised rats. **Acupuncture in Medicine**, v. 32, n. 6, p. 478–485, 2014.

Apêndice

8 APÊNDICE

APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA

DMO

ANOVA

DMO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,030	3	,010	83,454	,000
Within Groups	,002	20	,000		
Total	,032	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DMO

Tukey HSD

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
OVXDOA	OVXDO	,086167*	,006296	,000	,06854	,10379
	SDOA	,000333	,006296	1,000	-,01729	,01796
	SDO	,022333*	,006296	,010	,00471	,03996
OVXDO	OVXDOA	-,086167*	,006296	,000	-,10379	-,06854
	SDOA	-,085833*	,006296	,000	-,10346	-,06821
	SDO	-,063833*	,006296	,000	-,08146	-,04621
SDOA	OVXDOA	-,000333	,006296	1,000	-,01796	,01729
	OVXDO	,085833*	,006296	,000	,06821	,10346
	SDO	,022000*	,006296	,011	,00438	,03962
SDO	OVXDOA	-,022333*	,006296	,010	-,03996	-,00471
	OVXDO	,063833*	,006296	,000	,04621	,08146
	SDOA	-,022000*	,006296	,011	-,03962	-,00438

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

MICRO-CT

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BTVV	Between Groups	4686,497	3	1562,166	14,659	,000
	Within Groups	2131,272	20	106,564		
	Total	6817,769	23			
TbTh	Between Groups	,011	3	,004	1,592	,223
	Within Groups	,048	20	,002		
	Total	,060	23			
TbN	Between Groups	,092	3	,031	,148	,930
	Within Groups	4,122	20	,206		
	Total	4,213	23			
TbSp	Between Groups	,006	3	,002	,413	,746
	Within Groups	,104	20	,005		
	Total	,110	23			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) GRUPO	(J) GRUPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
BVTv		OVXDO	23,98667*	5,95997	,003	7,3051	40,6682
		OVXDOA	-13,96667	5,95997	,122	-30,6482	2,7149
		SDO	-4,33000	5,95997	,885	-21,0116	12,3516
		OVXDOA	-23,98667*	5,95997	,003	-40,6682	-7,3051
		OVXDO	-37,95333*	5,95997	,000	-54,6349	-21,2718
		SDO	-28,31667*	5,95997	,001	-44,9982	-11,6351
		OVXDOA	13,96667	5,95997	,122	-2,7149	30,6482
		SDO	37,95333*	5,95997	,000	21,2718	54,6349
		SDO	9,63667	5,95997	,392	-7,0449	26,3182
		OVXDOA	4,33000	5,95997	,885	-12,3516	21,0116
		SDO	28,31667*	5,95997	,001	11,6351	44,9982
		SDO	-9,63667	5,95997	,392	-26,3182	7,0449
		OVXDO	,00667	,02831	,995	-,0726	,0859
		OVXDOA	,00833	,02831	,991	-,0709	,0876
		SDO	-,04500	,02831	,407	-,1242	,0342
TbTh		OVXDOA	-,00667	,02831	,995	-,0859	,0726
		OVXDO	,00167	,02831	1,000	-,0776	,0809
		SDO	-,05167	,02831	,291	-,1309	,0276
		OVXDOA	-,00833	,02831	,991	-,0876	,0709
		SDO	-,00167	,02831	1,000	-,0809	,0776
		SDO	-,05333	,02831	,266	-,1326	,0259
		OVXDOA	,04500	,02831	,407	-,0342	,1242
		SDO	,05167	,02831	,291	-,0276	,1309
		SDO	,05333	,02831	,266	-,0259	,1326
		OVXDO	,13833	,26210	,951	-,5953	,8719
		OVXDOA	,03000	,26210	,999	-,7036	,7636
		SDO	,13500	,26210	,955	-,5986	,8686
		OVXDOA	-,13833	,26210	,951	-,8719	,5953
		OVXDO	-,10833	,26210	,976	-,8419	,6253
		SDO	-,00333	,26210	1,000	-,7369	,7303
TbN		OVXDOA	-,03000	,26210	,999	-,7636	,7036
		SDO	,10833	,26210	,976	-,6253	,8419
		SDO	,10500	,26210	,978	-,6286	,8386
		OVXDOA	-,13500	,26210	,955	-,8686	,5986
		SDO	,00333	,26210	1,000	-,7303	,7369
		SDO	-,10500	,26210	,978	-,8386	,6286
		OVXDO	-,03167	,04161	,871	-,1481	,0848
		OVXDOA	,01333	,04161	,988	-,1031	,1298
		SDO	-,00833	,04161	,997	-,1248	,1081
		OVXDO	,03167	,04161	,871	-,0848	,1481

	SDOA	,04500	,04161	,705	-,0715	,1615
	SDO	,02333	,04161	,942	-,0931	,1398
	OVXDOA	-,01333	,04161	,988	-,1298	,1031
SDOA	OVXDO	-,04500	,04161	,705	-,1615	,0715
	SDO	-,02167	,04161	,953	-,1381	,0948
	OVXDOA	,00833	,04161	,997	-,1081	,1248
SDO	OVXDO	-,02333	,04161	,942	-,1398	,0931
	SDOA	,02167	,04161	,953	-,0948	,1381

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

FSH

ANOVA

FSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25011,017	3	8337,006	34,850	,000
Within Groups	8612,147	36	239,226		
Total	33623,164	39			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: FSH

Tukey HSD

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
	OVXDO	1,69500	7,33662	,996	-18,0642	21,4542
OVXDOA	SDOA	50,72909*	6,75799	,000	32,5283	68,9299
	SDO	51,27455*	6,75799	,000	33,0737	69,4754
	OVXDOA	-1,69500	7,33662	,996	-21,4542	18,0642
OVXDO	SDOA	49,03409*	7,18687	,000	29,6782	68,3900
	SDO	49,57955*	7,18687	,000	30,2237	68,9354
	OVXDOA	-50,72909*	6,75799	,000	-68,9299	-32,5283
SDOA	OVXDO	-49,03409*	7,18687	,000	-68,3900	-29,6782
	SDO	,54545	6,59513	1,000	-17,2167	18,3076
	OVXDOA	-51,27455*	6,75799	,000	-69,4754	-33,0737
SDO	OVXDO	-49,57955*	7,18687	,000	-68,9354	-30,2237
	SDOA	-,54545	6,59513	1,000	-18,3076	17,2167

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

qRT-PCR

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MMP	Between Groups	,188	3	,063	,397	,757
	Within Groups	1,892	12	,158		
	Total	2,080	15			
RANKL	Between Groups	11,300	3	3,767	2,499	,109
	Within Groups	18,086	12	1,507		
	Total	29,386	15			
OC	Between Groups	1,091	3	,364	,519	,677
	Within Groups	8,400	12	,700		
	Total	9,490	15			

ANÁLISE HISTOLÓGICA

ANOVA

HISTO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,274	3	,091	25,207	,000
Within Groups	,047	13	,004		
Total	,321	16			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: QUANTIDADE

Tukey HSD

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
OVXDOA	OVXDO	,221050*	,040401	,001	,10247	,33963
	SDOA	-,115250	,042586	,075	-,24025	,00975
	SDO	-,004000	,042586	1,000	-,12900	,12100
OVXDO	OVXDOA	-,221050*	,040401	,001	-,33963	-,10247
	SDOA	-,336300*	,040401	,000	-,45488	-,21772
	SDO	-,225050*	,040401	,000	-,34363	-,10647
SDOA	OVXDOA	,115250	,042586	,075	-,00975	,24025
	OVXDO	,336300*	,040401	,000	,21772	,45488
	SDO	,111250	,042586	,088	-,01375	,23625
SDO	OVXDOA	,004000	,042586	1,000	-,12100	,12900
	OVXDO	,225050*	,040401	,000	,10647	,34363
	SDOA	-,111250	,042586	,088	-,23625	,01375

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexos

9 ANEXO

A- CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos da eletroacupuntura na regeneração do defeito ósseo em ratas ovariectomizadas*”, registrado com o número **226/2017**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 28 de janeiro de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 48 ratos Wistar-OLD fêmeas pesando 200g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 28/01/2019 a 22/01/2020.

We certify that the Protocol *nº 226/2017*, entitled “*Effects of electroacupuncture on bone defect regeneration in ovariectomized rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 01/28/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 48 female Wistar-OLD rats weighing 200g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 01/22/2020.

Ribeirão Preto, 28 de janeiro de 2019

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP