

ANA PAULA REBUCCI LIRANI GALVÃO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA
INTENSIDADE SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO DE
RATAS OVARECTOMIZADAS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PAULA REBUCCI LIRANI GALVÃO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA
INTENSIDADE SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO DE
RATAS OVARECTOMIZADAS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Marise Lazaretti Castro

Co-orientadores: Profa. Dra. Cássia de Toledo Bergamaschi

Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva

Orientador Estrangeiro: Prof. Dr. Pierre Dominique Delmas

São Paulo
2008

Lirani-Galvão, Ana Paula Rebucci

Efeitos da Estimulação Elétrica de Baixa Intensidade sobre o Metabolismo Ósseo de Ratas Ovariectomizadas/ Ana Paula Rebucci Lirani Galvão, 2008.

171 p.

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Título em Inglês: Effects of Low Intensity Electrical Stimulation on Bone Metabolism of Ovariectomized Rats.

1. Estimulação Elétrica. 2. Ovariectomia. 3. Óxido Nítrico. 4. Histomorfometria, 5. Osteócitos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

Disciplina de Endocrinologia

Chefe do Departamento de Medicina:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador da Pós-Graduação em Endocrinologia:

Prof. Dr. Sérgio Atala Dib

Chefe da Disciplina de Endocrinologia:

Prof. Dr. Antonio Roberto Chacra

Banca Examinadora:

Presidente da Banca: Profa. Dra. Marise Lazaretti Castro

Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó

Profa. Dra. Daniela Cristina Carvalho de Abreu

Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini

Trabalho realizado com apoio financeiro concedido pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) durante Doutorado no País, e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior.

*Aos meus pais, João e
Lurdinha, meus maiores
exemplos de perseverança,
dedicação e amor.*

*Ao meu marido Eduardo,
pelo apoio e carinho
incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conduzir por caminhos tão abençoados e frutíferos.

Aos meus pais, João e Lurdinha, e aos meus irmãos, João Paulo e Heloisa, por todo amor, carinho e incentivo sempre.

Ao meu marido Eduardo, pelo admirável e inabalável apoio durante minha estada na França, pelo companheirismo, paciência e amor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marise Lazaretti Castro, pelo exemplo de competência e trabalho, por todos os ensinamentos, dedicação e disponibilidade.

À Profa. Dra. Cássia de Toledo Bergamaschi pelo exemplo de profissional dedicada, por todos os conselhos, ensinamentos, incentivo, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva pelo grande incentivo, conselhos e ajuda na realização deste trabalho.

Aos funcionários da Disciplina de Endocrinologia, em especial à Geni, pelo suporte na realização das densitometrias ósseas, e à Amaryllis, Yeda, Valkíria, Mena, Fátima, Margarete, Vanda e Ilda, por todo apoio técnico e/ou administrativo que viabilizou este trabalho.

Às amigas do PRADO (Programa de Reabilitação e Atividade Física Direcionado ao Osteoporótico) - UNIFESP, Linda, Mônica e Rose, pelos bons momentos compartilhados, aprendizado e conquistas que marcaram esta fase.

Aos demais pós-graduandos do grupo do Cálcio, Márcia, Audrey, Sérgio, Elisabete, Patrícia, Monique e Marília, e aos professores Dra. Cynthia Brandão, Dra. Dolores Pardini e Dr. Gilberto Vieira pela agradável convivência e troca de conhecimentos científicos.

Ao Prof. Dr. Ruy Campos por ter me acolhido tão gentilmente no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória – UNIFESP.

Aos funcionários, Kátia, Antonio Nicolau e Airton e aos alunos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória (UNIFESP), em especial à Nayda, Beth, Bruno, Raphael, Adilson e Adriana por toda ajuda, amizade e ótimo ambiente de trabalho. Ao Raphael, pela paciente ajuda na realização dos experimentos de hemodinâmica.

Ao Prof. Dr. Pierre Delmas (*in memoriam*), por ter aceitado como orientanda em seu laboratório de pesquisa (INSERM unidade 831), e pelo exemplo de profissionalismo e entusiasmo contagiante pela Ciência.

À Dra. Pascale Chavassieux, pela dedicação, ensinamentos e ajuda em todos os momentos durante meu estágio em Lyon.

À Dra. Nathalie Portero-Muzy pela disponibilidade, suporte técnico e amizade durante meu estágio em Lyon.

À todos os funcionários e pesquisadores do INSERM unidade 831, Lyon, França, em especial à Brigitte Burt-Pichard, Christine Fournieret, Helene Follet, Georges Boivin, Jean-Paul Roux, Monique Arlot, Delphine Farlay, Yohann Bala, Audrey Doublier, Blandine Merle, Mark Forwood e Deepak Vanishith pela carinhosa acolhida, amizade e ajuda durante meu estágio em Lyon.

À Dra. Vanda Jorgetti e ao Dr. Aluizio Carvalho, pelos ensinamentos de histomorfometria óssea e acolhida em seus respectivos laboratórios.

À toda minha família e amigos, que me deram todo o suporte, carinho e incentivo durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
LISTAS	x
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Tecido Ósseo e Piezoelectricidade.....	04
1.2 Agentes Físicos e Tecido Ósseo.....	04
1.3 Estimulação Elétrica.....	05
1.4 Osteócitos.....	10
1.5 Óxido Nítrico.....	11
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Cirurgia: Ovariectomia Bilateral.....	21
4.2 Tratamentos.....	22
4.2.1 Inibidor da Enzima Óxido Nítrico Sintase.....	22
4.2.2 Estimulação Elétrica de Baixa Intensidade.....	23
4.3 Densitometria Óssea.....	24
4.4 Parâmetros Hemodinâmicos.....	25
4.5 Preparo das Amostras.....	26
4.6 Histomorfometria Óssea.....	27
4.7 Imunohistoquímica para a Enzima Óxido Nítrico Sintase.....	28
4.8 Ensaios para Apoptose de Osteócitos.....	29

4.8.1 Técnica de Caspase.....	30
4.8.2 Técnica de TUNEL.....	31
4.8.3 Contagem de Células Apoptóticas.....	31
4.9 Análise Estatística.....	32
5. ARTIGOS.....	34
Artigo 1.....	35
Artigo 2.....	40
Artigo 3.....	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
7. CONCLUSÕES.....	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
9. ANEXOS.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

Português

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DMO	Densidade Mineral Óssea
EE	Estimulação Elétrica
PEMF	Campo Eletromagnético Pulsado
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
TGF β_1	Fator de Crescimento transformador β_1
PLA $_2$	Fosfolipase A $_2$
RANKL	Ligante do Ativador do Receptor do Fator Nuclear kB
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
GTP	Trifosfato de Guanosina
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclica
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N G -monometil-L-arginina
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
PA	Pressão Arterial
FC	Frequência Cardíaca
OV/ BV	Volume Osteóide como % do Volume Ósseo

OS/ BS	Superfície Osteóide como % da Superfície Óssea
Ob.S/ BS	Superfície de Osteoblastos como % da Superfície Óssea
ES/ BS	Superfície de Reabsorção como % da Superfície Óssea
MAR	Taxa de Aposição Mineral
MS/BS	Superfície de Mineralização dividida pela Superfície Óssea
BFR/BS	Taxa de formação óssea dividida pela superfície óssea
Tb.Th	Espessura Trabecular (em micrometros)
Tb.Sp	Separação trabecular (em micrometros)
Tb.N	Número de trabéculas por milímetro
N.Nd/TV	Número de Nodos dividido pelo Volume Trabecular

Inglês

FDA	Food and Drug Administration
PEMF	Pulsed Electromagnetic Field
ES	Electrical Stimulation
LIES	Low Intensity Electrical Stimulation
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling
PBS	Phosphate-Buffered Saline
TBS	Tris-Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albumin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do mecanismo de ação da estimulação elétrica.....	07
Figura 2. Desenho esquemático da síntese de óxido nítrico.....	13
Figura 3. Equipamento de estimulação elétrica.....	24
Figura 4. Áreas de medida para contagem de células apoptóticas em lâminas histológicas de tibia de ratas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seis grupos de ratas submetidas ao protocolo de 12 semanas.....	23
---	----

RESUMO

A estimulação elétrica de baixa intensidade (EE) tem sido utilizada para o reparo ósseo, mas pouco se sabe sobre seus efeitos no tecido ósseo após a menopausa. Os osteócitos provavelmente desempenham um importante papel mediando este estímulo físico, e poderiam agir como transdutores através da liberação de sinais bioquímicos como o óxido nítrico (NO). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da EE no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas, e se o NO poderia ser um mediador destes efeitos. Sessenta ratas (200-220g) foram divididas em 6 grupos: SHAM; SHAM tratado com 6mg/d de L-NAME, um inibidor da NO sintase (SHAM-L-NAME); ovariectomizado (OVX); OVX tratado com L-NAME (OVX-L-NAME) ou submetido a uma estimulação elétrica no corpo todo do animal (OVX-EE) ou ambos (OVX-EE-L-NAME) por 12 semanas. A densidade mineral óssea (DMO) global, de coluna e membro posterior foram medidas através de densitometria óssea antes e ao final do protocolo. Após o sacrifício, as tíbias foram retiradas para análises histomorfométricas e imunohistoquímicas. A apoptose de osteócitos (técnicas de caspase-3 e TUNEL) e expressões da NO sintase endotelial (eNOS) e indutível (iNOS) foram analisadas por imunohistoquímica. As ratas OVX demonstraram significativa ($p < 0.05$ vs SHAM) diminuição da DMO final global, de coluna e de membro posterior, medidas por densitometria, redução de volume ósseo (10% vs 25%) e número de trabéculas (1.7 vs 3.9), e aumento das superfícies de reabsorção (4.7% vs 3.2%) e mineralização (15.9% vs 7.7%), medidas por histomorfometria. No entanto, após a EE, todos estes parâmetros foram semelhantes aos valores do grupo SHAM e significativamente diferentes de OVX. A EE não foi capaz de prevenir a redução de volume ósseo e número de

trabéculas causadas pela OVX na presença de L-NAME (OVX-L-NAME vs OVX-EE-L-NAME), como o fez na ausência deste inibidor da NOS. Porém, o L-NAME não bloqueou os efeitos da EE na reabsorção óssea (superfícies de reabsorção e de osteoclastos) em ratas OVX. A eNOS e iNOS foram expressas de forma semelhante no córtex das tíbias de SHAM, não expressas em OVX, e similarmente expressas em OVX-EE quando comparadas ao SHAM. As expressões de eNOS e iNOS não foram detectadas no tecido ósseo de nenhum grupo tratado com L-NAME. Nas ratas OVX, a porcentagem de osteócitos apoptóticos (24%) foi significativamente maior do que em SHAM (11%) e OVX-EE (8%). Todos os grupos tratados com L-NAME tiveram uma diminuição na porcentagem de osteócitos apoptóticos. Assim, nosso estudo evidenciou que a EE previne alguns efeitos causados pela OVX no tecido ósseo preservando a DMO, estrutura e microarquitetura ósseas, expressão de eNOS e iNOS e viabilidade de osteócitos. Além disso, foi demonstrado que o L-NAME bloqueia parcialmente os efeitos da EE na estrutura óssea (mas não na reabsorção) e na expressão de eNOS e iNOS em ratas OVX, sugerindo que o NO possa ser um mediador dos efeitos positivos da EE no tecido ósseo. No entanto, não foi possível identificar se os efeitos positivos da EE na viabilidade de osteócitos foram mediados pelo NO, pois os efeitos do L-NAME nestas células foram semelhantes àqueles causados pela EE.

Palavras-chave: Estimulação Elétrica, Ovariectomia, Óxido Nítrico, Histomorfometria, Osteócitos.

ABSTRACT

Low Intensity Electrical Stimulation (LIES) has been used for bone repair but little is known about its effects on bone after menopause. Osteocytes probably play a role in mediating this physical stimulus and they could act as transducers through the release of biochemical signals, such as nitric oxide (NO). The aim of the present study was to investigate the effects of LIES on bone metabolism in ovariectomized rats, and if NO could be a mediator of these effects. Sixty rats (200-220g) were divided into 6 groups: SHAM; SHAM treated with 6mg/d of L-NAME, an inhibitor of NO synthase (SHAM-L-NAME); ovariectomized (OVX); OVX treated with L-NAME (OVX-L-NAME) or subjected to a whole body electrical stimulation (OVX-LIES) or both (OVX-LIES-L-NAME) for 12 weeks. Global, spine and posterior limb bone mineral density (BMD) were measured by bone densitometry before and at the end of protocol. After sacrifice, tibias were collected for histomorphometric and immunohistochemistry analysis. Osteocyte apoptosis (caspase-3 and TUNEL techniques) and expressions of endothelial NO synthase (eNOS) and inducible NOS (iNOS) were assessed by immunostaining. OVX rats showed significant ($p < 0.05$ vs SHAM) decreased final global, spine and limb BMDs, measured by densitometry, decreased bone volume (10% vs 25%) and trabecular number (1.7 vs 3.9), and increased eroded surfaces (4.7% vs 3.2%) and mineralization surfaces (15.9% vs 7.7%), measured by histomorphometry. In contrast, after LIES, all these parameters tended to be similar to SHAM and significantly different from OVX. LIES was not able to prevent the reduction of bone volume and trabecular number caused by OVX in the presence of L-NAME (OVX-L-NAME vs OVX-LIES-L-NAME), as it did in the absence of this NOS inhibitor. However, L-NAME did not block the effects of LIES

on bone resorption (eroded surface and osteoclasts surface) in OVX rats. eNOS and iNOS were: similarly expressed in tibiae cortices of SHAM, not expressed in OVX and correspondingly expressed in OVX+LIES when compared to SHAM. eNOS and iNOS expressions were not detected on bone of none of L-NAME treated groups. In OVX, the percentage of apoptotic osteocytes (24%) was significantly increased when compared to SHAM (11%) and OVX-LIES (8%). All L-NAME treated groups showed a diminished percentage of apoptotic osteocytes. In conclusion, our study showed that LIES counteracts some effects of OVX on bone tissue preserving BMD, bone structure and microarchitecture, iNOS and eNOS expression and osteocyte viability. Moreover, it was demonstrated that L-NAME partially blocks the effects of LIES on bone structure (but not on bone resorption) and on iNOS and eNOS expressions in OVX rats, suggesting that NO may be a mediator of the positive effects of LIES on bone. However, it was not possible to identify if the known positive effects of LIES on osteocyte viability were mediated by NO, since the effects of L-NAME on these cells were similar to those caused by LIES.

Key-words: Electrical Stimulation, Ovariectomy, Nitric Oxide, Histomorphometry, Osteocyte.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial e, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o Brasil terá 13 milhões de idosos em 2030, o que representará a sexta população mundial de idosos em número absoluto. Este avanço da idade será responsável por um grande aumento na incidência de doenças crônicas como, por exemplo, a osteoporose (Shephard, 2003).

Atualmente, estima-se que mais de 200 milhões de pessoas sofram de osteoporose no mundo todo (Cooper et al., 1992). Aproximadamente 30% das mulheres pós-menopausadas tem osteoporose nos Estados Unidos e Europa, e 40% destas mulheres terão uma ou mais fraturas devido à osteoporose até o final da vida (Melton et al., 1992).

A osteoporose é definida como uma desordem esquelética caracterizada por resistência óssea comprometida predispondo o indivíduo a um maior risco de fratura. Neste contexto, a resistência óssea corresponde à integração entre densidade e qualidade óssea (NIH, 2001). A organização mundial de saúde (WHO, 1994) define osteoporose como densidade mineral óssea (DMO) a partir de 2.5 desvios padrão abaixo da média para mulheres adultas jovens e caucasianas. Estudos mostram que para cada 1.0 desvios padrão da DMO média para jovens, o risco de ocorrer uma fratura vertebral aumenta em 2 a 2.4 vezes, e o risco para uma fratura não-vertebral aumenta em 1.7 vezes (Ross et al., 1996). A alta incidência desta doença em mulheres na pós-menopausa ocorre devido à queda dos níveis de estrogênio, que promove um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea com predomínio desta última.

A osteoporose e suas conseqüentes fraturas têm um grande impacto na saúde pública pelo aumento na morbi-mortalidade e pelos custos econômicos

que, só nos Estados Unidos, chegam a 15 bilhões de dólares por ano (NIH, 2001). Estes números são ainda mais alarmantes em relação ao futuro, pois se calcula que, até o ano de 2050, a incidência de fraturas de quadril aumentará 240% em mulheres e 310% em homens (Gulbert et al., 1997).

Um estudo com idosos (n=301) em um bairro de classe média na cidade de São Paulo demonstrou a presença de osteopenia e/ou osteoporose em pelo menos um dos sítios analisados (vértebra ou fêmur) em 92.8% das mulheres acima de 70 anos (Camargo et al., 2005).

Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de novos medicamentos para osteoporose possibilitou uma redução no risco relativo de fratura vertebral em 50 a 65% (Zizic, 2004). Esta mesma eficácia, entretanto, não foi demonstrada em relação à prevenção de fraturas de quadril, onde poucas medicações são capazes de propiciar algum benefício. Além disso, efeitos adversos estão associados ao uso destas drogas, que mais comumente produzem alterações gastrointestinais como dores abdominais, náuseas, vômitos e diarréia (Biswas et al., 2003), além de distúrbios metabólicos e tromboembólicos (Sgarabotto et al., 2007). Embora raros no tratamento da osteoporose, são bastante temidas complicações como osteonecrose de mandíbula, fibrilação atrial e epidermólise (Marx et al., 2007) e acabam por prejudicar a aderência ao tratamento a longo prazo.

A busca por tratamentos mais custo efetivos e, se possível, sem efeitos colaterais indesejáveis tem sido intensa, já se antevendo o agravamento desta situação com o envelhecimento da população. A possibilidade de o tecido ósseo responder a estímulos físicos faz disto uma alternativa em potencial para o desenvolvimento de novas técnicas para a prevenção de fraturas.

1.1 Tecido Ósseo e Piezoelectricidade

A palavra piezoelectricidade literalmente significa “eletricidade de pressão”: o prefixo piezo é derivado da palavra grega *piezin* que significa pressão. O primeiro relato das propriedades piezoelétricas do osso foi feito por Fukada e Yasuda (1957) que, em um estudo com ossos humanos, constataram a piezoelectricidade do osso, pois este produziu, sob ação de uma carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo então a energia mecânica em energia elétrica (efeito piezoelétrico direto). Com esta descoberta, várias formas de tratamento têm sido sugeridas baseadas nesta propriedade do osso de transformar energia mecânica em energia elétrica, como o ultra-som pulsado de baixa intensidade desenvolvido por Duarte (1983).

Um campo elétrico pode ser diretamente induzido por fontes elétricas e eletromagnéticas ou indiretamente induzido via efeito piezoelétrico. Pilla (2002), em um estudo com osteotomias em fíbulas de coelhos, demonstrou que o campo elétrico induzido elétrica ou mecanicamente tem características comuns de forma de onda, e que ambos podem entregar doses similares de estimulação elétrica ao osso em reparo. Assim, este autor cita que um importante mensageiro afetando a atividade celular é o campo elétrico, sugerindo que o reparo e o remodelamento ósseos possam ser modulados utilizando-se sinais mecânicos (ultra-som e vibração) ou elétricos e eletromagnéticos (campo eletromagnético pulsado).

1.2 Agentes Físicos e Tecido Ósseo

Já são bem conhecidos, em estudos experimentais, os efeitos positivos do ultra-som (Duarte, 1983), da terapia laser (Garavello-Freitas et al., 2003; Lirani-Galvao et al., 2006), e da estimulação elétrica (EE) (Hsu al., 2003), todos de

baixa intensidade, no reparo ósseo (Lirani & Lazaretti-Castro, 2005 – anexo 1). Como conseqüência disto, o ultra-som pulsado de baixa intensidade tem sido utilizado em humanos para acelerar a consolidação de fraturas (Kristiansen, 1997; Rubin et al., 2001; Khan e Laurencin, 2008). A EE para o reparo ósseo também vêm sendo empregada clinicamente em casos de não-união óssea (Scott e King, 1994; Simonis et al., 2003) e fusão de vértebras (Akai et al., 2002; Gan e Glazer 2006), e ambas as técnicas estão aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) americana com estas indicações (Lind e Bunger, 2001).

Assim, sabe-se que estímulos mecânicos e elétricos de baixa intensidade podem influenciar a formação e reabsorção óssea, sugerindo que estas modalidades também possam ser usadas clinicamente para inibir ou reverter a osteopenia (Rubin e McLeod, 1996). No entanto, a literatura sobre os efeitos destes agentes físicos no tecido osteopênico ou osteoporótico ainda é muito escassa.

1.3 Estimulação Elétrica

A estimulação elétrica para reparo ósseo vem sendo utilizada para retardo de consolidação de fraturas e pseudartrose há mais de 3 décadas (Bassett et al., 1974; Bassett et al., 1977; Borsalino et al., 1988). Trabalhos com cultura primária de células ósseas de metacarpo de bovinos submetidas à EE mostraram um aumento significativo do conteúdo de cálcio e aceleração da formação mineral óssea avaliados, respectivamente, através de um método colorimétrico e microscopia eletrônica (Wiesmann et al., 2001), e um aumento da proliferação de osteoblastos em células da calvária de ratos recém-natos (Chang et al., 2004), quando comparados ao grupo controle. Em fêmures de ratos, a EE foi capaz de

promover a osteogênese aumentando a expressão gênica do colágeno tipo I e da osteocalcina, uma proteína expressa por osteoblastos e que indica formação óssea, conforme detectado por hibridização *in situ* (Takahashi et al., 2004).

Apesar dos diversos estudos citando os efeitos positivos da EE no tecido ósseo, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Brighton e cols (2001) demonstraram que os sinais elétricos estimulam a proliferação de células semelhantes a osteoblastos (linhagem MC3T3-E1) em cultura, e aumentam os níveis de prostaglandina E_2 , AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e $TGF\beta_1$ (fator de crescimento transformador β_1). Através do uso de inibidores metabólicos específicos, este estudo ainda evidenciou que o aumento na proliferação celular é decorrente de um incremento na concentração citoplasmática de cálcio causado pela EE por um mecanismo de abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes (figura 1). Para melhor compreensão deste mecanismo, é importante citar que a fosfolipase A_2 é uma enzima que leva ao aumento da prostaglandina E_2 , que por sua vez age como um fator autócrino e/ou parácrino para estimular a proliferação celular e possivelmente aumentar os níveis de cálcio intracelular (Feyen et al., 1985). Além disso, a calmodulina ativada é conhecida por promover a síntese de nucleotídeos e a proliferação celular (Crocker et al., 1988; Tomlinson et al., 1984).

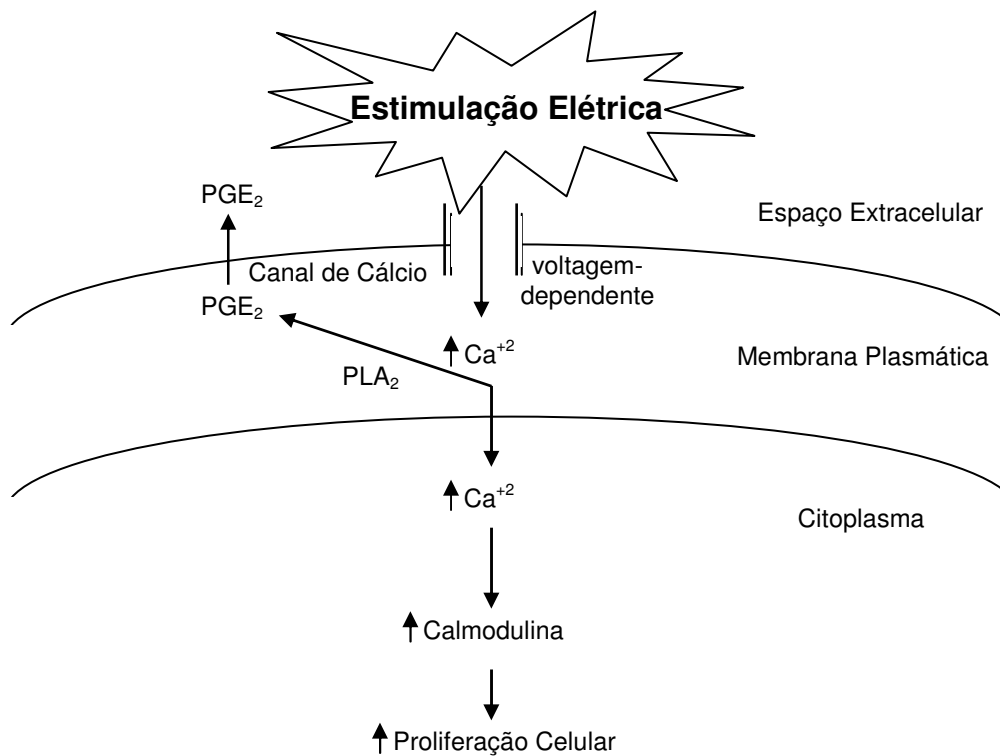


Figura 1 – Desenho esquemático do mecanismo de ação da estimulação elétrica por acoplamento capacitivo em cultura de células semelhantes a osteoblastos (linhagem MC3T3-E1) proposto por Brighton e cols. (2001). PGE₂ = prostaglandina E₂, PLA₂ = fosfolipase A₂. Desenho adaptado de Brighton e cols. (2001).

Brighton e cols (2001) ainda citaram que o mecanismo de ação do PEMF (*pulsed electromagnetic field*) difere da EE por mobilizar o cálcio intracelular, mas que ambos têm o mesmo mecanismo final que é o aumento dos níveis de calmodulina ativada e cálcio citoplasmático. Outros autores, no entanto, observaram que alterações na concentração intracelular de cálcio também podem mediar os efeitos da EE em células da cartilagem de galinhas (Rodan et al., 1978) e em células hepáticas humanas *in vitro* (Cho et al., 1999).

Silva e cols (1993) demonstraram que campos elétricos com freqüência semelhante àquela do ultra-som utilizado em estimulação do reparo ósseo (1.5

MHz), produzem aumento na incorporação de cálcio iônico intracelular em culturas de células ósseas, através da ativação de canais de transporte de cálcio do tipo L (sensíveis à variação de tensão elétrica) presentes na membrana plasmática. Em seguida, foi demonstrado em cultura de células semelhantes a osteoblastos humanos (linhagem MC3T3-E1) que os canais de transporte de cálcio do tipo L são mecano-sensíveis, ou seja, também respondem a estímulos mecânicos (Duncan & Hruska, 1994; Chen et al., 2000).

Mais recentemente demonstrou-se que, em cultura de osteoblastos da calvária de ratos, o estímulo com PEMF aumentou a proliferação celular e a atividade das proteinoquinases A, C e G. Estes fenômenos associaram-se a um aumento da concentração citoplasmática de cálcio e a ativação da calmodulina (Li et al., 2006).

Estudos *in vitro* sugerem que o PEMF atue sobre o tecido ósseo através da regulação de osteoclastos e osteoblastos. Em cultura de células da medula óssea de ratos, o PEMF diminuiu o recrutamento de células semelhantes a osteoclastos em 33% e a porcentagem da superfície de reabsorção em 29%, quando comparado ao grupo controle. Nas culturas de células estimuladas com PEMF notou-se uma diminuição significativa das concentrações de RANKL (ligante do ativador do receptor do fator nuclear kB), assim como um aumento de 23% na concentração de osteoprotegerina. Estas duas substâncias são produzidas pelos osteoblastos e controlam a diferenciação e atividade dos osteoclastos (Chang et al., 2005). Células semelhantes a osteoblastos humanos (linhagem MG63) também são sensíveis ao PEMF, pois respondem a este estímulo com um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno e produção de osteocalcina (Lohmann et al., 2000).

Assim, são inúmeros os estudos que demonstram que a EE tem efeitos positivos no tecido ósseo, mas são poucos os trabalhos que avaliam seus efeitos no tecido osteopênico ou osteoporótico. Em 1984, nos Estados Unidos, Brighton e Pollack (1984) obtiveram a aprovação da patente de um estimulador elétrico para prevenir e tratar a osteoporose de desuso em membros posteriores de ratos, pois apresentaram ao órgão responsável relatos de um ganho significativo de massa óssea e resistência mecânica, mas estes dados não foram publicados na literatura científica, não servindo de embasamento para as investigações subseqüentes.

Embora os mecanismos de ação da EE e do PEMF no tecido osteopênico não tenham sido elucidados, algumas investigações clínicas já apontam os efeitos positivos destes agentes físicos em humanos. Tabrah e cols (1990) utilizaram o PEMF no antebraço de mulheres osteoporóticas por 3 meses e observaram um aumento significativo na DMO do rádio. Em um estudo duplo cego e randomizado, 40 mulheres pós-menopausadas foram expostas ao PEMF (n = 20) ou placebo (n = 20) por 1h/dia, 3 vezes por semana por 3 meses (o campo gerado expunha a coluna vertebral e pelve). No grupo tratado houve um aumento significativo na osteocalcina sérica e no peptídeo C-terminal do pró-colágeno tipo I, que são marcadores de formação óssea, embora não tenha sido detectada variação significativa de massa óssea neste pequeno intervalo de tempo (Giordano et al., 2001). Em 2005 nos Estados Unidos, foi criada a patente de um PEMF para tratar osteoporose em humanos, com parâmetros semelhantes aos estimuladores comercialmente disponíveis para tratar fraturas, mas novamente seus autores não publicaram resultado algum na literatura (Tepper et al, 2005). Desta forma, fica

claro que são necessários trabalhos científicos de qualidade para elucidar os efeitos da EE no tecido osteopênico e osteoporótico.

1.4 Osteócitos

O conceito de que o tecido ósseo se adapta à carga mecânica a ele imposta data de 1892, quando Wolff descreveu que o osso responde à carga mecânica através da adaptação de sua microarquitetura (Wolff, 1892). Décadas mais tarde, a capacidade única dos osteócitos de se comunicar a partir da matriz óssea mineralizada com elementos celulares na superfície óssea, medula óssea e vasos sanguíneos, tornou estas células os candidatos mais lógicos para a percepção e resposta às deformações mecânicas (Aarden et al., 1994). Osteócitos são células ósseas derivadas de osteoblastos que cessaram a produção de matriz óssea (Palumbo et al., 1990), encontram-se inseridas na matriz óssea mineralizada e são conectadas umas às outras e à superfície óssea através de uma rede criada por seus prolongamentos citoplasmáticos (Aarden et al., 1994).

Atualmente sabe-se que os osteócitos agem como mecanosensores e transdutores através da liberação de fatores bioquímicos, como o óxido nítrico (NO), que podem modular a atividade de osteoclastos e osteoblastos de acordo com a carga mecânica recebida (Burger & Klein-Nulend, 1999). Assim, na ausência de estímulo mecânico, a viabilidade de osteócitos decresce e o número de osteoclastos aumenta (Aguirre et al., 2006), o que propicia uma deterioração da microarquitetura e da DMO.

Da mesma forma, o aumento da fragilidade óssea resultante do uso de glicocorticóides (Weinstein et al., 1998) e deficiências estrogênica (Tomkinson et

al., 1997) e androgênica (Kousteni et al., 2001) está associado a uma maior prevalência de morte celular programada, ou apoptose, de osteócitos. Estudos recentes têm demonstrado que a densidade de osteócitos (Ma et al., 2008) e os níveis de produtos de NO circulantes (Wimalawansa, 2007) são significativamente reduzidos com a deficiência estrogênica, como constatado em ratas ovariectomizadas (Ma et al., 2008) e em mulheres pós-menopausadas (Wimalawansa, 2007).

Por outro lado, vários trabalhos evidenciam que a apoptose de osteócitos pode ser reduzida através da estimulação mecânica (Noble et al., 2003; Bakker et al., 2004; Basso e Heersche, 2006; Tan et al., 2006). Em um estudo *in vitro*, realizado com células da calvária de galinhas, foi demonstrado que a ação do estímulo mecânico em osteócitos tem como consequência a inibição da formação de osteoclastos e da reabsorção óssea (Tan et al., 2007).

O NO tem um importante papel na modificação do *turnover* ósseo em resposta ao estímulo mecânico (Zaman et al., 1999) e estudos *in vitro* já comprovaram que este estímulo induz a liberação de NO por osteócitos (Klein-Nulend et al. 1995a; Zaman et al., 1999; Vatsa et al., 2006). Assim, as pesquisas relativas aos efeitos da estimulação mecânica nos osteócitos estão se tornando esclarecedoras, enquanto que os efeitos da EE na viabilidade de osteócitos ainda são desconhecidos.

1.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um importante sinalizador celular que age em diferentes tecidos regulando uma série de processos fisiológicos e celulares. Sabe-se que dentre os processos regulados por ele estão a vasodilatação e regulação do tono

vascular normal, inibição de agregação plaquetária, neurotransmissão, resposta inflamatória, apoptose e motilidade celular. Sua síntese ocorre via oxidação de L-arginina pela enzima NO sintase (NOS) (figura 2). O NO formado, de reduzido tamanho molecular e de natureza lipofílica, é difundido para fora de suas células de origem para células alvo, onde penetra no citoplasma e se liga ao grupamento heme da enzima guanilato ciclase. Esta enzima assim ativada transforma o trifosfato de guanosina (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que então atua como segundo mensageiro em várias células incluindo células nervosas, do músculo liso, monócitos e plaquetas (Ignarro, 1990).

A NOS possui duas isoformas básicas, que são as indutíveis por citocinas e as constitutivas. Estas últimas, por sua vez, podem ser neuronais ou endoteliais, e são reguladas principalmente pelo cálcio e pela calmodulina (Marletta, 1993), ambos citados anteriormente como importantes participantes do mecanismo de ação da EE no osso. A isoforma indutível da NO sintase (iNOS) foi originalmente descrita em macrófagos ativados, mas depois foi identificada em monócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, miócitos, fibroblastos e osteoblastos. A isoforma neuronal (nNOS), foi encontrada primeiramente em neurônios do sistema nervoso central e periférico, e então descrita no músculo esquelético, epitélio pulmonar e nos sistemas gastrointestinal e geniturinário. Já a isoforma endotelial (eNOS), foi citada como presente no endotélio vascular e em cardiomiócitos, e posteriormente descrita em processos inflamatórios nos mais diversos tecidos (Dudzinski et al., 2006).

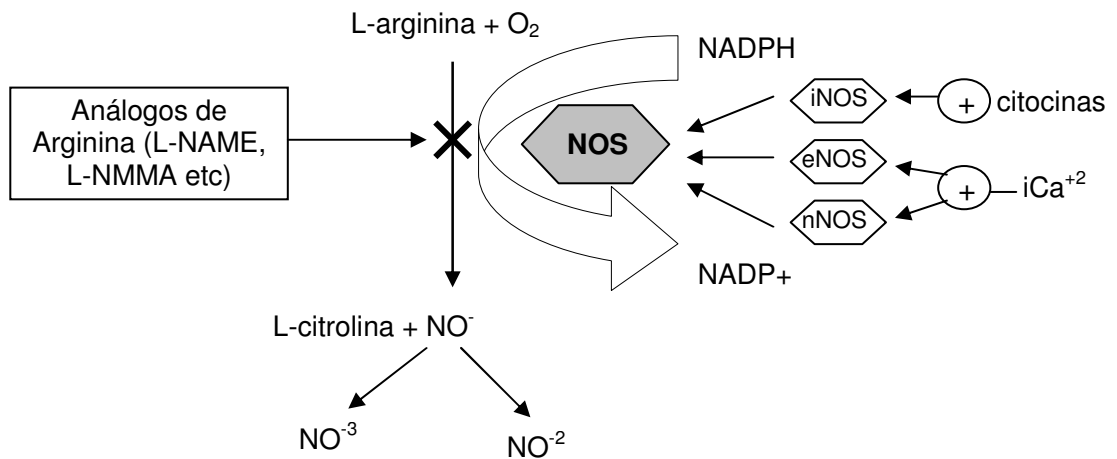


Figura 2 – Desenho esquemático da síntese de óxido nítrico. NADP = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; iCa^{+2} = cálcio intracelular. Adaptado de Ralston (1997).

A isoforma predominante expressa no tecido ósseo é a eNOS, que é fortemente expressa em osteócitos e condrócitos (Caballero-Alias 2004, Van't Hof e Ralston 2001, Zaman et al. 1999). A nNOS é também expressa em osteócitos (Caballero-Alias 2004) e a iNOS já foi observada em osteoclastos, osteócitos e condrócitos (Van't Hof e Ralston 2001; Watanuki et al., 2002) em resposta a deformação mecânica, e está provavelmente envolvida na regulação do reparo ósseo (Diwan et al., 2000).

No tecido ósseo, o NO é uma molécula de sinalização importante e é produzida em resposta a diversos estímulos como citocinas pró-inflamatórias (Van't Hof & Ralston, 2001), estimulação mecânica (Zaman et al., 1999; Watanuki et al., 2002; Bakker et al., 2005) e hormônios sexuais (Wimalawansa et al., 1996; Cuzzocrea et al., 2003). O estrógeno estimula a atividade da eNOS em células osteoblásticas (Armour e Ralston, 1998) e os efeitos do estrógeno na formação óssea podem ser atenuados em ratos *knockout* para eNOS (Cuzzocrea et al.,

2003). A eNOS também faz a mediação dos efeitos de cargas mecânicas no esqueleto, atuando com as prostaglandinas para promover formação óssea e suprimir a reabsorção (Van't Hof e Ralston, 2001). O NO é capaz de estimular a diferenciação osteoblástica em células da medula óssea humana (Huang et al., 2008-b) e de inibir a ativação de osteoclastos através do aumento da expressão da osteoprotegerina e diminuição da expressão do RANKL em cultura de células da medula óssea de camundongos (Fan et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado que o NO pode prevenir os efeitos deletérios da ovariectomia no tecido ósseo em ratas (Wimalawansa et al., 1996, Hukkanen et al. 2003) e em humanos (McFarlane et al., 2004), considerando que os efeitos benéficos do estrógeno no tecido ósseo incluem a supressão de citocinas pró-inflamatórias (Cutolo et al., 2003) e a própria síntese de NO (Ignarro, 1989), entre outros fatores. É importante ressaltar que os efeitos do estrógeno nas propriedades mecânicas das artérias também são mediados pelo NO derivado da eNOS, que se encontra suprimida em ratas ovariectomizadas (Guo et al., 2006).

A EE também é capaz de induzir a síntese de NO em osteoblastos humanos, e esta produção é comparável àquela induzida por tratamento com estrógeno (Hamed et al., 2006). Em outro estudo, Martini e cols. (2003) avaliaram os efeitos da EE em células semelhantes a osteoblastos humanos (linhagem MG63) e, 24 horas após o tratamento, observaram um aumento significativo nos níveis de osteocalcina e NO.

Além dos efeitos no tecido ósseo, em uma investigação com condrócitos *in vitro* foi verificado, através de inibidores específicos, que o mecanismo do PEMF para aumentar a proliferação destas células envolve o NO, e a produção de NO

pode ser resultado de uma cascata que envolve o cálcio, a calmodulina e o GMP cíclico (Fitzsimmons et al., 2008). Estes autores ainda citam que o uso de L-NAME, um inibidor da NOS, preveniu o aumento nos níveis de NO, GMP cíclico e conteúdo de DNA causado pelo PEMF nos condrócitos.

Assim, baseado no exposto acima, já existem trabalhos com cultura de células mostrando que o NO tem um importante papel na transdução do sinal elétrico no osso. No entanto, não há, até o presente momento, estudos *in vivo* que demonstrem que o NO possa ter alguma relação com os efeitos da EE no metabolismo ósseo.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a carência de investigações sobre os efeitos do campo elétrico na osteogênese do tecido osteoporótico e visando propor alternativas de tratamento e prevenção de uma doença de tão grande prevalência como a osteoporose, o presente estudo destinou-se a elucidar os efeitos específicos do campo elétrico aplicado de forma sistêmica no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. Além disso, foi verificado se o óxido nítrico participa da mediação destes efeitos neste modelo experimental.

A possibilidade de prevenção e tratamento desta enfermidade com medidas simples e econômicas como é a estimulação elétrica, traria grandes benefícios para nossos pacientes e para a sociedade como um todo, levando-se em conta que os recursos econômicos para a saúde são restritos e que ocorre um aumento progressivo da expectativa de vida, resultando no envelhecimento de nossa população.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Analisar os efeitos da estimulação elétrica de baixa intensidade no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas.

Objetivos Específicos:

1. Verificar se a aplicação da estimulação elétrica causa alguma alteração significativa na densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas;
2. Analisar os efeitos da estimulação elétrica sobre parâmetros histomorfométricos de remodelamento, estrutura, microarquitetura e conectividade trabecular do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas;
3. Analisar os efeitos da estimulação elétrica sobre a expressão da enzima óxido nítrico sintase e sobre a viabilidade de osteócitos do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas;
4. Verificar se o óxido nítrico participa da mediação dos efeitos da estimulação elétrica no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas sessenta ratas Wistar (200-220g, em média com 3 meses de idade), divididas em seis grupos: grupo SHAM, submetido a cirurgia de ovariectomia simulada; grupo OVX, submetido a cirurgia de ovariectomia bilateral; grupo OVX-EE, submetido a cirurgia de ovariectomia bilateral e tratamento com estimulação elétrica; grupo SHAM-L-NAME submetido a ovariectomia simulada e tratamento com L-NAME; grupo OVX-L-NAME, submetido a ovariectomia bilateral e tratamento com L-NAME; e por fim, o grupo OVX-EE-L-NAME, ovariectomizado, tratado com a estimulação elétrica e L-NAME. Estes grupos serão descritos detalhadamente a seguir.

4.1 Cirurgia: Ovariectomia Bilateral

Sessenta ratas Wistar (200-220g) foram anestesiadas com xilazina (Syntec® - 20 mg/kg) e ketamina (Agener® -40 mg/Kg), IP, para a realização aleatória de ovariectomia bilateral (n=40, OVX) ou cirurgia SHAM (n=20), realizadas de acordo com o Modelo Cirúrgico Experimental em Estudo de Osteoporose e protocolo descrito por Giardino e cols (1993). Este modelo cirúrgico é reconhecidamente eficaz para induzir perda de massa óssea em ratas (Peng et al., 1997; Omi e Ezawa, 1995). Todas as cirurgias foram realizadas de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (lei 6638/ 08 de maio de 1979) e com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA, 1991), sob condições padrão de assepsia e sob anestesia geral. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, sob protocolo número 0530/06 (anexo 2).

Os animais foram mantidos em decúbito ventral, após tricotomia e assepsia cirúrgica da região média dorsal. Na região lombar foi realizada uma pequena incisão na pele (1,5-2,0 cm), aproximadamente na metade entre o meio do dorso e a base da cauda. Após afastamento do músculo espinhal, os ovários foram encontrados rodeados por tecido gorduroso de quantidade variável. Foram realizados ligadura seletiva dos vasos sanguíneos útero-ovariano com fio de sutura reabsorvível e um corte na junção entre a tuba de Falópio e o corno uterino juntamente com a gordura periovariana, removendo os ovários da rata. Na cirurgia SHAM, foi apenas verificada a existência de ambos os ovários, que foram então preservados. Ao final, após observar perfeita hemostasia, os planos foram suturados (aproximação do músculo e sutura da pele). Todos os animais receberam o antiinflamatório não-esteróide Ketoprofeno (Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda - 0,2 ml/Kg) via intramuscular após o ato cirúrgico, de 24/24hs por 2 dias.

4.2 Tratamentos

4.2.1 Inibidor da Oxido Nítrico Sintase

Os animais dos grupos SHAM-L-NAME, OVX-L-NAME e OVX-EE-L-NAME (n=10 em cada grupo) receberam diariamente 06 mg/Kg de L-NAME (N ω -nitro-L-arginina methyl ester, Sigma Chemical Co., Alemanha), um inibidor da enzima NOS, por gavagem durante todo o período do protocolo (12 semanas) (tabela 1). Esta dose de L-NAME foi escolhida com base na literatura (da Cunha et al., 2004) com o objetivo de causar um efeito inibidor da NOS sem, porém, causar uma hipertensão exagerada.

4.2.2 Estimulação Elétrica

Vinte ratas (OVX-EE e OVX-EE-L-NAME) receberam uma estimulação elétrica pulsada de baixa intensidade (EE) (potência de saída: 30 mW, tensão: 40 V pico-a-pico, frequência: 1.5 MHz, ciclo de trabalho de 1:4) em sessenta sessões de 20 minutos cada, 5 vezes por semana, com início no 7º dia pós-cirúrgico, em um total de 12 semanas de tratamento.¹

Tabela 1 – Seis grupos de ratas submetidas ao protocolo de 12 semanas (n=10 em cada).

GRUPO	CIRURGIA	TRATAMENTO
SHAM	SIMULADA	NENHUM
SHAM-L-NAME	SIMULADA	L-NAME
OVX	OVARECTOMIA BILATERAL	NENHUM
OVX L-NAME	OVARECTOMIA BILATERAL	L-NAME
OVX-EE	OVARECTOMIA BILATERAL	ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
OVX-EE-L-NAME	OVARECTOMIA BILATERAL	ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E L-NAME

O equipamento de estimulação elétrica foi desenvolvido no laboratório de Eletrônica do Departamento de Bioengenharia da Universidade de São Paulo (São Carlos, SP), sob supervisão do Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva. Eletrodos metálicos (30 x 21 cm) foram posicionados superior e inferiormente a gaiola dos ratos (distância de 16 cm entre eles), conforme mostra a figura 3, com o objetivo de submeter o corpo todo do animal a este campo elétrico por acoplamento capacitivo.

¹ A abreviação de estimulação elétrica (EE) deste trabalho, está como ES (electrical stimulation) no artigo 1 e como LIES (low intensity electrical stimulation) nos artigos 2 e 3. Todas estas 3 siglas se referem a esta mesma estimulação elétrica de baixa intensidade acima descrita.

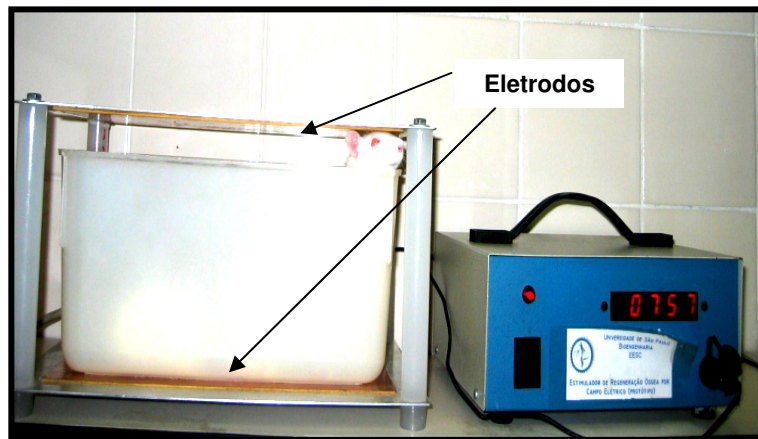


Figura 3 - Equipamento de Estimulação Elétrica

Os animais foram mantidos sob condições apropriadas de luz e temperatura (ciclos alternados de claro e escuro de 12 horas e temperatura ao redor de 25°C) no biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória/ UNIFESP e tiveram livre acesso a água e ração. Na fase final do protocolo, todas as ratas receberam 20mg/kg de tetraciclina por via intraperitoneal (Terramicina, Pfizer, Sao Paulo, Brasil), nos dias 11 e 10 (primeira marcação) e 5 e 4 (segunda marcação) anteriores ao sacrifício. Esta dupla marcação com tetraciclina foi utilizada para análise de parâmetros dinâmicos de formação óssea, pertencentes à análise histomorfométrica, que será abordada no item 4.6.

4.3 Densitometria Óssea

Todas as ratas foram submetidas à densitometria óssea do fêmur e tíbia direitos, coluna, e corpo total, além da composição corporal, no 7º dia após a cirurgia (para evitar uma nova anestesia e o manejo do animal logo após a cirurgia) e uma semana antes do sacrifício. O exame foi realizado na Disciplina de Endocrinologia- UNIFESP, em aparelho Hologic 4500 A (Whaltham, MA, EUA), e analisados por um software específico para pequenos animais (Version 610-0691

for QDR XP) (modelo de exame de densitometria óssea em ratos no anexo 3). O coeficiente de variação do método foi avaliado pela análise da variação de 2 medidas consecutivas após reposicionamento dos 60 animais. O coeficiente de variação máximo permitido foi estabelecido em 1%. A análise da densitometria óssea foi feita por um investigador cego.

Para a realização deste exame, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina com a mesma dose acima citada para a cirurgia de ovariectomia.

4.4 Parâmetros Hemodinâmicos

A fim de acompanharmos os possíveis efeitos hemodinâmicos causados pelo tratamento crônico com L-NAME ou pela EE, foram avaliados a pressão arterial, frequência cardíaca e o débito cardíaco das ratas ao final do protocolo.

Na véspera do sacrifício, os animais foram novamente anestesiados (xilazina-ketamina, 20-40 mg/Kg) e submetidos a canulação via artéria femoral para registro direto da pressão arterial da artéria aorta abdominal com tubos de polietileno adaptados ao tamanho do animal. As cânulas foram exteriorizadas na região da cintura escapular para não provocar desconforto no animal. Vinte e quatro horas depois, a pressão arterial (PA) foi registrada batimento a batimento (200 Hz) por meio de um amplificador analógico digital (PowerLab/8SP – AD Instruments, Austrália) e, a partir do sinal de PA pulsátil, foram obtidos os registros de pressão arterial média e frequência cardíaca (FC). Todos os experimentos relativos ao sistema cardiovascular foram realizados no laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória/ UNIFESP sob a supervisão da Prof^a Dr^a Cássia de Toledo Bergamaschi.

No dia do sacrifício, os animais foram anestesiados lentamente com uretana 1,2-1,4g/Kg IV. Foi, então, realizada uma traqueostomia para diminuir a resistência das vias aéreas, o ar inspirado foi enriquecido com oxigênio e a temperatura corporal foi mantida em 37°C por meio de um sistema servo-controlado. O débito cardíaco foi estimado pelo método de termodiluição utilizando o sistema Cardiomax III (Columbus Instruments Inc.). Este sistema permitiu a determinação do débito cardíaco, PA e do volume sistólico e, a partir das medições da PA, pôde-se determinar a resistência periférica total. Um termistor foi introduzido na raiz da aorta pela artéria carótida direita e outro cateter foi colocado até o átrio direito pela veia jugular direita, onde injeções de salina fisiológica foram realizadas em bôlus (100µL) para estimativa do débito cardíaco (Biancardi et al., 2007).

4.5 Preparo das Amostras

O sacrifício foi realizado logo após os experimentos de hemodinâmica através de overdose anestésica. Em seguida, com o auxílio de um esteroscópico, constatou-se a atrofia uterina e a ausência dos ovários em todas as ratas ovariectomizadas, bem como a preservação destas estruturas nas ratas submetidas à cirurgia simulada (grupo SHAM). As tíbias foram dissecadas e coletadas para análise de histomorfometria óssea (tíbias direitas) e métodos de imunohistoquímica (tíbias esquerdas).

Os segmentos proximais das tíbias direitas foram fixados em etanol 70%, desidratados, embebidos em metilmetacrilato (protocolo de histologia para tecido ósseo não-descalcificado) e seccionados longitudinalmente com um micrótomo Policromo S (Reichert-Young, Heidelberg, Alemanha). Secções de 5 µm de

espessura das amostras foram coradas com azul de toluidina (pH 6.4) e secções de 7 µm sem coloração foram preparadas para observação sob luz ultravioleta. Pelo menos duas laminas não-consecutivas coradas e não-coradas foram examinadas para cada amostra de tibia.

As tíbias esquerdas foram fixadas em paraformaldeído 4% (pH 7.4) por 3 a 4 dias antes da descalcificação em EDTA 16% (pH 7.4) por 22 dias. A etapa do EDTA foi realizada em um béquer, com o uso de agitador, dentro de um refrigerador a 4º C, corrigindo o pH do EDTA e/ou trocando a solução sempre que necessário. Após a descalcificação, as tíbias proximais foram incluídas em parafina. Secções longitudinais de 7 µm foram realizadas e utilizadas para métodos de imunohistoquímica descritos a seguir.

4.6 Histomorfometria Óssea

Parâmetros que refletem o remodelamento ósseo foram medidos com um método semi-automático (Osteometrics Inc., Atlanta, GA) no Hospital do Rim/ UNIFESP sob supervisão do Prof. Dr. Aluizio Carvalho. Estes parâmetros incluem: volume osteóide como porcentagem do volume ósseo (OV/ BV, %), a superfície osteóide como porcentagem da superfície óssea (OS/ BS, %), a superfície de osteoblastos como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/ BS, %) e a superfície de reabsorção como porcentagem da superfície óssea (ES/ BS, %). Com este método, ainda foram analisados parâmetros dinâmicos como: taxa de aposição mineral (MAR) e superfície de mineralização/ superfície óssea (MS/BS) calculadas como superfícies de dupla marcação + ½ marcação simples. A taxa de formação óssea/ superfície óssea (BFR/BS) foi calculada como (MS/BS) × (MAR) (Chavassieux et al., 2001).

Os parâmetros de estrutura, microarquitetura e conectividade óssea foram mensurados através de um método automático de análise de imagens (Bone, Explora Nova, La Rochelle, França) equipado com uma câmera digital Microfire Optronic e foram obtidos com os softwares Bone e MorphoExpert (Explora Nova, La Rochelle, França), específicos para histomorfometria óssea. Estas análises foram realizadas durante o Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior, na Université de Lyon, INSERM unidade 831, Lyon, França, sob orientação do Prof. Dr. Pierre D. Delmas e co-orientação da Dra. Pascale Chavassieux. Estes parâmetros foram: volume ósseo, que expressa a porcentagem da área trabecular ocupada por tecido ósseo (BV/TV, %), espessura trabecular (Tb.Th, μm), separação trabecular (Tb.Sp, μm), número de trabéculas (Tb.N, /mm) derivados das medidas de área e perímetro de acordo com a fórmula de Parfitt (Parfitt et al., 1983), e o número de nodos (N.Nd/TV). As abreviações dos parâmetros histomorfométricos utilizados foram derivados da nomenclatura padrão do Comitê da ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) (Parfitt et al., 1987).

4.7 Imunohistoquímica para a Enzima Óxido Nítrico Sintase

A imunohistoquímica para a enzima NOS foi realizada em lâminas de tecido ósseo descalcificado incluso em parafina utilizando um anticorpo policlonal de coelho para eNOS e outra lâmina com anticorpo policlonal de coelho para iNOS (Abcam, Cambridge, MA) para cada animal. O método de imunohistoquímica foi baseado em Basso e Heersche (2006). O protocolo por nós utilizado encontra-se detalhado no anexo 4. Resumidamente, cortes histológicos

desparafinizados (previamente aderidos em lâminas) e hidratados foram incubados em glicina por 20 minutos e em 0.2g de tripsina 250, 0.2g de cloreto de cálcio e 1M de hidróxido de sódio em TBS por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas para bloqueio da peroxidase com o kit Dakocytomation Envision® + sistema HRP, para uso com anticorpo primário de coelho (código K4010, Carpinteria, EUA) por 15 minutos, e em solução de bloqueio por 20 minutos. As etapas subseqüentes foram: 1) incubação com o anticorpo primário (1:100) em uma câmara úmida a +4°C por uma noite; 2) lavagem com TBS + 0.1% Tween-20 (TBS-Tw); 2) incubação com anticorpo secundário de cabra anti-coelho por 25 minutos (controles negativos sem este anticorpo); 3) lavagem com TBS-Tw; 4) incubação com o substrato DAB; 5) contra-coloração com hematoxilina de Mayer; 6) desidratação, limpeza e montagem com Eukitt.

A positividade da reação foi avaliada pela cor marrom, visualizada em microscopia óptica, representando o complexo antígeno-anticorpo formado. As regiões contendo células NOS-positivas foram avaliadas no osso cortical e trabecular na metáfise e diáfise das tíbias das ratas, com um método semi-quantitativo com uma escala de 3 pontos (ausente, presente ++ ou +).

4.8 Ensaios para Apoptose

Foram realizadas as técnicas de Caspase-3 e TUNEL com o objetivo de se confirmar a localização das células apoptóticas. Sucintamente, a técnica de caspase detecta a atividade da caspase-3, que é parte de uma família de moléculas que são mediadoras da apoptose, e a caspase-3 tem sido demonstrada como uma das caspases mais ativadas no processo de morte celular programada, sugerindo que esta tem um papel fundamental na morte

celular (Faleiro et al., 1997). Já a técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*) detecta a quebra de DNA intranucleossômica, identificando a morte celular programada *in situ* (Gavrieli et al., 1992).

Todos os ensaios de imunohistoquímica (NOS, caspase e TUNEL) foram realizados em 2007 durante o Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior na Université de Lyon, INSERM unidade 831, Lyon, França, sob orientação do Prof. Dr. Pierre D. Delmas e co-orientação da Dra. Pascale Chavassieux.

4.8.1 Técnica de Caspase

O protocolo utilizado neste trabalho foi adaptado de Follet e cols (2007). A técnica detalhada do método imunohistoquímico empregado encontra-se no anexo 5. De maneira sucinta, as lâminas com os cortes histológicos desparafinizados foram hidratados e a peroxidase endógena foi inativada através de incubação em H₂O₂ 3% em metanol por 5 minutos. Em seguida, foram realizadas: 1) incubação em 1.5% de solução de bloqueio de soro de cabra (VectaStain ABC Kit) em PBS por 30 minutos; 2) incubação com anticorpo primário (caspase-3(H-277), sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluído 1:25 em PBS + Triton X-100 a 0.3% + albumina de soro bovino a 0.1%) a +4 °C durante 1 noite; 3) lavagem com PBS Tween; 4) incubação com anticorpo secundário de cabra anti-coelho por 45 minutos; 5) incubação com o substrato DAB; 5) contra-coloração com verde de metila; 6) desidratação, limpeza e montagem com Eukitt.

4.8.2 Técnica de TUNEL

Para esta técnica, foi utilizado o kit Klenow FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem, Alemanha), e o protocolo do mesmo foi utilizado, conforme consta no anexo 6.

De forma concisa, as lâminas contendo os cortes histológicos desparafinizados e hidratados, foram submetidas a: 1) permeabilização em 2mg/ml de Proteinase K 1:100 em 10 mM de Tris (pH 8) por 20 minutos e lavadas em TBS; 2) utilização de um controle positivo com 1µg/ml de Dnase I em 1X TBS/1 mM MgSO₄ por 20 minutos e lavado com TBS; 3) inativação de peroxidases endógenas com H₂O₂ 30%, 1:10 em metanol por 5 minutos; 4) incubação com *Klenow equilibration buffer* (1:10 com água destilada) por 20 minutos seguido de *Klenow labeling reaction mixture* a 37°C por 1.5 horas, *Stop Buffer* por 5 minutos e *Blocking Buffer* por 10 minutos, ambos a temperatura ambiente; 5) detecção da atividade da peroxidase com DAB por 10-15 minutos; 6) lavagem com água destilada, 7) contra-coloração com verde de metila; 8) desidratação, limpeza e montagem com Eukitt.

4.8.3 Contagem das Células Apoptóticas

Dois cortes histológicos por animal (um corte com a técnica de TUNEL e um com a técnica de Caspase) foram avaliados através de microscopia óptica com aumento de 400 vezes. As medidas foram realizadas em cada córtex na região proximal na metáfise e no córtex da diáfise, na área central da tíbia, como ilustra a figura 4. Em cada campo de 62.5 mm² foram contados: os osteócitos positivamente marcados (apoptóticos), negativamente marcados (osteócitos viáveis), lacunas vazias e o número total de lacunas, através do software

Exploranova Morphoexpert (Explora Nova, La Rochelle, França), e suas respectivas densidades foram expressas como porcentagem do número total de lacunas.

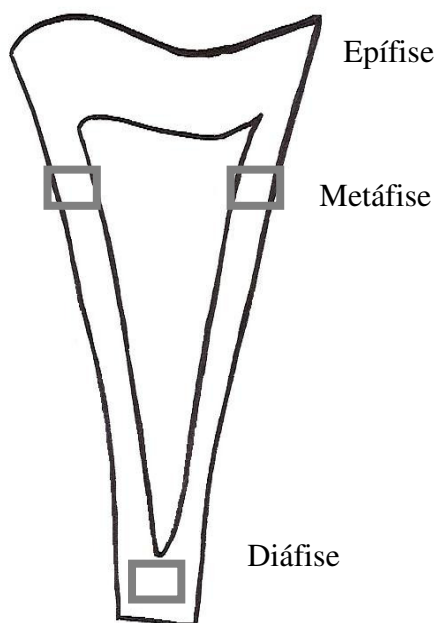


Figura 4 – Áreas de medida para contagem de células apoptóticas em lâminas histológicas de tíbia de ratas. O tamanho de cada área analisada é de 62.5 mm².

4.9 Análise Estatística

O nível de significância foi estabelecido em 5% para todas as análises. Para a análise estatística dos resultados da densitometria óssea e hemodinâmica, foi utilizado o programa *GraphPad Prism*, versão 3.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Os grupos foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) e o pós-teste de Tukey-Kramer foi aplicado para determinar as diferenças significativas entre os grupos e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Para análise dos resultados de histomorfometria óssea e apoptose de osteócitos, foi utilizado o programa *Statview*, versão 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Foram realizados testes não-paramétricos e as comparações entre os 6 grupos foram obtidas por análise de variância de uma via pelo teste de Kruskal-Wallis. Se a diferença fosse significativa, a comparação entre os 2 grupos era feita através do teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

Electrical field stimulation improves bone mineral density in ovariectomized rats

A.P.R. Lirani-Galvão¹,
C.T. Bergamaschi²,
O.L. Silva²
and M. Lazaretti-Castro³

¹Divisão de Endocrinologia, Escola Paulista de Medicina,
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

²Divisão de Ciências da Saúde, Universidade Federal de São Paulo,
Campus Baixada Santista, Santos, SP, Brasil

³Departamento de Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

Abstract

Osteoporosis and its consequent fractures are a great social and medical problem mainly occurring in post-menopausal women. Effective forms of prevention and treatment of osteoporosis associated with lower costs and the least side effects are needed. Electrical fields are able to stimulate osteogenesis in fractures, but little is known about their action on osteoporotic tissue. The aim of the present study was to determine by bone densitometry the effects of electrical stimulation on ovariectomized female Wistar rats. Thirty rats (220 ± 10 g) were divided into three groups: sham surgery (SHAM), bilateral ovariectomy (OVX) and bilateral ovariectomy + electrical stimulation (OVX + ES). The OVX + ES group was submitted to a 20-min session of a low-intensity pulsed electrical field (1.5 MHz, 30 mW/cm²) starting on the 7th day after surgery, five times a week (total = 55 sessions). Global, spine and limb bone mineral density were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA Hologic 4500A) before surgery and at the end of protocol (84 days after surgery). Electrical stimulation improved ($P < 0.05$) global (0.1522 ± 0.002), spine (0.1502 ± 0.003), and limb (0.1294 ± 0.003 g/cm²) bone mineral density compared to OVX group (0.1447 ± 0.001 , 0.1393 ± 0.002 , and 0.1212 ± 0.001 , respectively). The OVX + ES group also showed significantly higher global bone mineral content (9.547 ± 0.114 g) when compared to both SHAM (8.693 ± 0.165 g) and OVX (8.522 ± 0.207 g) groups ($P < 0.05$). We have demonstrated that electrical fields stimulate osteogenesis in ovariectomized female rats. Their efficacy in osteoporosis remains to be demonstrated.

Key words

- Rats
- Osteoporosis
- Ovariectomy
- Electrical stimulation
- Bone mineral density
- Osteogenesis

Correspondence

A.P.R. Lirani-Galvão
Rua Gonçalves da Cunha, 130/74
04140-040 São Paulo, SP
Brasil
Fax: +55-11-5579-6636
E-mail: analirani@fics.unesp.br

A.P.R. Lirani-Galvão has a
fellowship from CNPq.

Publication supported by FAPESP.

Received November 29, 2005
Accepted July 21, 2006

Osteoporosis is characterized by low bone mineral density (BMD) and deterioration of bone microarchitecture that increases bone susceptibility to fracture (1). Postmenopausal and senile osteoporosis are the most common primary forms of bone loss seen in clinical practice. In the development of os-

teoporosis, there is often a long latent period before the appearance of the main clinical manifestation, i.e., pathologic fractures (2).

Women are more affected than men because of the decrease in sexual steroids after menopause. Osteoporosis evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) accord-

ing to WHO criteria was found in 33.2% of females and 16.1% of males in an elderly population from the city of São Paulo, Brazil (3). In white women over 50 years old, the risk of osteoporotic fracture is nearly 40% over their remaining lifetime (4) and has a huge impact on their life quality and mortality.

In general, all available pharmacological treatments for osteoporosis decrease the relative risk of a new fracture by about 50 to 65% (1). Nevertheless, besides the high costs of these treatments, adverse events such as dyspeptic conditions (nausea, vomiting, abdominal pain) (5) and metabolic and thromboembolic disturbances are not infrequently observed in patients receiving any of the available drugs for the treatment of osteoporosis, limiting the compliance with this kind of treatment.

Considering its high incidence, alternative treatments with best cost benefit rates for postmenopausal osteoporosis have been investigated. Since bone is a piezoelectric material - i.e., when deformed it can transform mechanical energy into electrical energy - some physical agents have been suggested. Electrical stimulation for bone repair has been used for three decades and was approved by the Food and Drug Administration (FDA) for pseudarthrosis and bone non-union (6). Mechanical or electrical stimuli of relative low amplitude and high frequency can influence bone formation and resorption *in vitro* and *in vivo*, suggesting that these modalities can be used clinically to inhibit or reverse osteopenia (7).

The objective of the present study was to determine by bone densitometry the effects of long-term electrical stimulation in ovariectomized rats.

The study was approved by the Ethics Committee for Animal Research, School of Medicine of the Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, under protocol number 1381/04. Thirty female Wistar rats (220 ± 10 g) were operated according to the

ethical principles for animal experimentation of the International Council for Laboratory Animal Science (8). They were subjected to 20 mg/kg xilazine anesthesia (Vetbrands[®], Jacareí, SP, Brazil), and 40 mg/kg ketamine, *ip* (Vetbrands[®]) for bilateral ovariectomy (OVX, N = 20) or sham operation (SHAM, N = 10). The surgical experimental model of ovariectomy described in the osteoporosis study by Giardino et al. (9) was used in the present investigation since ovariectomized rats have been used as an accepted model of postmenopausal osteoporosis. The other 10 rats (SHAM group) were submitted to the same procedure but the ovaries were not removed.

Animals were kept in cages under appropriate light and temperature conditions (alternate cycles of 12 h and temperature approximately 25°C), with free access to water and food.

Rats were divided into three groups (N = 10 per group): OVX and SHAM rats did not receive any treatment. OVX + ES rats (OVX rats submitted to electrical field stimulation) received a low-intensity pulsed electrical field treatment (1.5 MHz, 1:4 duty cycle, 30 mW/cm²) in 55 sessions of 20 min, five times a week for 11 weeks, starting on the 7th day after surgery (DAS) in order to avoid pain due to early manipulation.

The electrical field stimulation equipment was constructed in the electronics laboratory of Bioengineering Department (University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil). Metal electrodes (25 x 35 cm) were positioned on the upper and lower parts of the cage in order to submit the entire body of the rats to this low-intensity electrical field through capacitated coupling, which does not cause any discomfort to the animals. The electronic unit and the dosage parameters were the same as those of low-intensity pulsed ultrasound, which is approved by American FDA to accelerate bone healing (6).

All animals were submitted to bone den-

sitometry (DXA - Hologic, model 4500 A, Waltham, MA, USA) using the specific software for small animals to evaluate global, spine and lower limb BMD (g/cm^2), global bone mineral content (BMC, g) and body composition. The exam was performed in a blind fashion on the 7th DAS and on the day before sacrifice (84 DAS).

Groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). The Tukey-Kramer post test was applied to determine significant differences among the 3 groups, with the level of significance set at 5% in all analyses. The GraphPad Prism, version 3.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) software was used. Data are reported as means \pm SEM.

On the 7th DAS (basal), there was no difference between groups regarding weight, global BMD or global BMC. At the end of the 84-day protocol (Table 1), BMD and BMC were lower in the OVX group compared to the SHAM group, demonstrating the efficiency of ovariectomy in our model. Final global BMD was significantly lower in the OVX than the OVX + ES and SHAM groups, as shown in Figure 1. Percent gains of global BMD ($\Delta\%$) were significantly higher in the SHAM and OVX + ES groups than in the OVX group. Similarly, the spine and lower limb BMD of SHAM and OVX + ES were higher than that of the OVX group. At the end of treatment, the group that received electrical stimulation (OVX + ES) presented a significantly higher BMC than the OVX and SHAM groups. The same occurred when BMC + lean mass was compared among groups, with statistical relevance for OVX + ES when compared to OVX and SHAM. All data are summarized in Table 1.

Ovariectomy-induced osteoporosis in female rats is a well-accepted and established model for the study of postmenopausal osteoporosis (9). The efficacy of ovariectomy in our experiment could be demonstrated by BMD values, which did not in-

crease in the OVX group as much as in the SHAM group. Using this model, our results demonstrated that the exposure of ovariectomized rats to electrical fields for 20 min a day, five times a week maintained the same bone mass as that detected in the sham-operated rats. This fact was consistent in all bone regions evaluated (global, spine and lower limb).

The beneficial effects of low-intensity electrical stimulation on bone have been demonstrated in other models, such as male rats with disuse-induced osteoporosis after limb immobilization (10) or after sciatic neurectomy (11). Pulsed electromagnetic fields (PEMF) can significantly suppress trabecular bone loss and restore trabecular bone structure in bilaterally ovariectomized rats evaluated by histomorphometry (12). However, the present study is the first to demonstrate the efficacy of electric stimulation to

Table 1. Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) parameters obtained at the end of the experiment.

DXA parameters	SHAM	OVX	OVX + ES
$\Delta\%$ BMD	8.492 \pm 1.062*	3.305 \pm 1.108	9.701 \pm 1.483*
Final global BMD (g/cm^2)	0.1495 \pm 0.001*	0.1447 \pm 0.001	0.1522 \pm 0.002*
Final spine BMD (g/cm^2)	0.1511 \pm 0.003*	0.1393 \pm 0.002	0.1502 \pm 0.003*
Final lower limb BMD (g/cm^2)	0.1333 \pm 0.002*	0.1212 \pm 0.001	0.1294 \pm 0.003*
Final global BMC (g)	8.893 \pm 0.165	8.522 \pm 0.207	9.547 \pm 0.114**
Final BMC + lean mass (g)	208.820 \pm 11.090	189.940 \pm 6.010	237.960 \pm 4.580*

Data are reported as mean \pm SEM values of the DXA parameters obtained for the three groups at the end of the experiment after 55 sessions for 11 weeks. OVX = ovariectomy; OVX + ES = ovariectomy plus electrical stimulation; BMD = bone mineral density; $\Delta\%$ BMD = percent BMD gain after the protocol; BMC = bone mineral content. *P < 0.05 vs OVX; **P < 0.05 vs OVX and SHAM (one-way ANOVA).

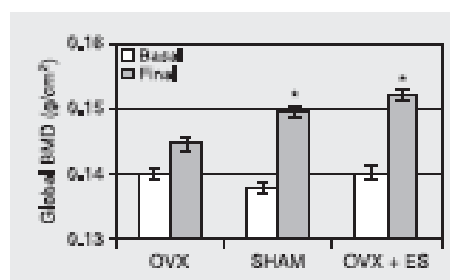


Figure 1. Global bone mineral density before and after electrical field stimulation. The ovariectomized rats received 5 sessions of irradiation per week for 11 weeks. BMD = bone mineral density; OVX = ovariectomy; OVX + ES = ovariectomy plus electrical stimulation. *P < 0.05 vs final OVX (one-way ANOVA).

prevent bone loss in all bone regions after ovariectomy in rats.

In human beings, electric and electromagnetic stimulation have been safely used for physical rehabilitation for a long time, but there are only few studies in the literature aiming at the prevention or treatment of osteoporosis using electrical stimulation. In a blind and randomized clinical trial, 40 post-menopausal osteoporotic patients were exposed at the spine and pelvis level to PEMF or placebo for 1 h/day, three times a week for 3 months. In the treated group there was a significant increase in serum osteocalcin and C-terminal peptide of pro-collagen type I levels, both markers of bone formation. These results suggest that PEMF can stimulate osteogenesis in a 3-month treatment by augmenting osteoblastic activity in postmenopausal osteoporotic women. The authors, however, could not demonstrate any effect on BMD, but it is known that three months is a short period of time to observe any alteration in bone mass (13). Tabrah et al. (14) determined the effect of a PEMF on bone density of the radii of osteoporosis-prone women for a period of 12 weeks. BMD of the treated radii measured by single-photon densitometry increased significantly in the area during the exposure period. Their data suggest that properly applied PEMF, if scaled for whole-body use, may have clinical application in the prevention and treatment of osteoporosis.

The cellular mechanism of electrical stimulation is not totally clear, but osteoblasts in culture are sensitive to electrical stimulation, resulting in an enhancement of the biomineralization process (15). Biochemical pathways are activated when electrical stimulation is applied to bone cells. Signal transduction of the capacitated coupling, the same as used here, has been shown to translocate Ca^{2+} ions through cell-mem-

brane voltage-gated calcium channels, inducing an increase in cytosolic Ca^{2+} (16). Capacitated coupled electric fields accelerate cell proliferation and differentiation in osteoblast-like cells *in vitro* and enhance cell synthesis, leading to matrix formation and maturation (17). PEMF have been recently demonstrated to regulate osteoclastogenesis, bone resorption, osteoprotegerin, receptor activator of NF κ B-ligand and macrophage colony-stimulating factor concentrations in a murine marrow culture system (18).

Martini et al. (19) studied the effects of an electrical field applied to osteoblast-like human cells in culture. After 24 h of treatment they noticed a significant increase in osteocalcin and nitric oxide (NO) production. In another study, osteoblasts of the MC3T3-E1 lineage with or without an NO synthase inhibitor (L-NMMA) were exposed to PEMF stimulation for 15 days. PEMF significantly increased NO synthesis, cellular proliferation and osteoblast differentiation. These effects were associated with an increase in NO synthesis since the addition of L-NMMA inhibited all the stimulatory effects of PEMF (20). Thus, the most recent hypothesis about the effects of electrical fields on bone cells has considered NO production as an essential pathway.

Our data showed a consistently positive effect of electrical field stimulation on BMD and BMC, preventing ovariectomy-induced osteoporosis in female rats. The stimulation of female rats with an electrical field for 11 weeks was able to prevent the bone loss induced by ovariectomy. Our results encourage us to continue in this research field, studying the mechanisms of electrical field stimulation in bone metabolism for possible future application to the prevention and treatment of different forms of osteoporosis.

References

- Zizic TM. Pharmacologic prevention of osteoporotic fractures. *Am Fam Physician* 2004; 70: 1293-1300.
- Glaser DL, Kaplan FS. Osteoporosis. Definition and clinical presentation. *Spine* 1997; 22: 125-165.
- Camargo MB, Cendoroglo MS, Ramos LR, de Oliveira Latona MR, Saraiva GL, Lage A, et al. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of São Paulo, Brazil. *Osteoporos Int* 2005; 16: 1451-1460.
- Melton LJ III, Beck TJ, Amin S, Khosla S, Achenbach SJ, Oberg AL, et al. Contributions of bone density and structure to fracture risk assessment in men and women. *Osteoporos Int* 2005; 16: 480-487.
- Biswas PN, Wilton LV, Shakir SA. Pharmacovigilance study of alendronate in England. *Osteoporos Int* 2003; 14: 507-514.
- Lind M, Burger C. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J* 2001; 10 (Suppl 2): S102-S109.
- Rubin CT, McLeod KJ. Inhibition of osteopenia by biophysical intervention. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (Editors), *Osteoporosis*. San Francisco: Academic Press; 1998.
- COBEA. Ethical principles on animal experimentation. *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*. <http://www.sbpq.org.br/info/info6.html>; 1991.
- Giardino R, Fini M, Giavarsesi G, Mongiorgi R, Gnudi S, Zall A. Experimental surgical model in osteoporosis study. *Bol Soc Ital Biol Sper* 1993; 69: 453-460.
- Martin RB, Gutman W. The effect of electric fields on osteoporosis of disease. *Calcif Tissue Res* 1978; 25: 23-27.
- Brighton CT, Pollack SR. Uspto patent full-text and image database. US Patent No. 4,487,808. Access at <http://patft.uspto.gov/> January 2005.
- Chang K, Chang WH. Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: a prostaglandin E2-associated process. *Bioelectromagnetics* 2003; 24: 189-198.
- Giordano N, Battisti E, Geraci S, Fortunato M, Santacroce C, Rigato M, et al. Effect of electromagnetic fields on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in osteoporosis: a single-blind, randomized pilot study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2001; 62: 187-193.
- Tabrah F, Hoffmeier M, Gilbert F Jr, Bakkin S, Bassett CA. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *J Bone Miner Res* 1990; 5: 437-442.
- Wisemann H, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 28-37.
- Brighton CT, Wang W, Seldes R, Zhang G, Pollack SR. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A: 1514-1523.
- Hartig M, Joos U, Wisemann HP. Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation *in vitro*. *Eur Biophys J* 2000; 29: 499-508.
- Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res* 2005; 23: 1308-1314.
- Martini L, Giavarsesi G, Fini M, Tomicelli P, de Preilo M, Schadsen W, et al. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblast-like cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003; 289-290.
- Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 2002; 7: 18-23.

ARTIGO 2

Data: Fri, 5 Sep 2008 07:21:25 -0400 [05-09-2008 08:21:25 BRT]
De: calcified.tissue@ed.ac.uk
Para: analirani@fcr.epm.br
Assunto: Calcified Tissue International CTI-08-0214
Cabeçalhos: [Exibir Todos os Cabeçalhos](#)
05-Sep-2008

Dear Mrs. Lirani-Galvao,

Your manuscript entitled, Low Intensity Electrical Stimulation Counteracts the Effects of Ovariectomy on Bone Tissue of Rats: Effects on Bone Microarchitecture, Viability of Osteocytes and Nitric Oxide Expression, has been reviewed and I am pleased to say that it has been judged to be generally suitable for publication in Calcified Tissue International, provided that some changes can be made, as suggested by the enclosed comments from the reviewers.

With your revision, please provide a separate list for the reviewer(s) identifying by number the criticism and explain how the criticism has been addressed by the revision. If you feel that no revision should be made, please explain your position.

For your resubmission, please log-on to <https://mc.manuscriptcentral.com/cti>, using your username and password. If you forgot your password, click on "Password Help" and enter your e-mail address (the one used in this message), and your account information will be immediately e-mailed to you. Please, use this account for your resubmission. Upon successful log on, click on "Author Center", then click on Manuscripts with Decisions to find your original submission. When you are ready, click on Create a Revision, and you will be taken to the Submit a Revision area. In the first page, make sure to enter your replies to the reviewer and to the Editor in the space below the Decision Letter, before moving forward. Failure to include replies to reviewers may be taken as a sign of an unresponsive revision, thus compromising a final decision. If you cannot complete your submission, the draft of your submission will be placed in the Revised Manuscripts in Draft list in your Author Center, which you can access when you return. Please, do not resubmit your manuscript as new, as this will result in substantial delays in the review process.

If you have problems or questions about this process, you are welcome to contact one of our editorial offices at calcified_tissue@msnotes.wustl.edu, or calcified.tissue@ed.ac.uk. In any case, please do not e-mail your manuscripts to the editorial offices. Review will not start until the revision is properly submitted on-line.

Please note that our current editorial policy allows us to consider a manuscript as revised if it is resubmitted within 4 months of the date of this letter. After that time, the file will be closed and any submissions will be considered as new.

Sincerely,

Prof. Stuart Ralston, Editor
calcified.tissue@ed.ac.uk

Low Intensity Electrical Stimulation Counteracts the Effects of Ovariectomy on Bone Tissue of Rats: Effects on Bone Microarchitecture, Viability of Osteocytes and Nitric Oxide Expression.

Lirani-Galvão^{1,2} APR, Chavassieux¹ P, Portero-Muzy¹ N, Bergamaschi² CT, Silva³ OL, Carvalho² AB, Lazaretti-Castro² M, Delmas¹ PD.

¹INSERM Unité 831, Université de Lyon, Lyon, France, ²Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil.

¹INSERM Unité 831. Faculté de Médecine R. T. H. Laënnec, rue G. Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France.

² Disciplina de Endocrinologia , Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo 910, CEP 04039-002, São Paulo, SP, Brazil

³Bioengenharia, Universidade de São Paulo, Av Trabalhador Sancarlene, 400 CEP 13566-590, São Carlos, SP, Brazil.

Running title – Electrical Stimulation Counteracts Effects of Ovariectomy in Rats

Corresponding author:

Ana Paula Rebucci Lirani-Galvão

Rua Gonçalo da Cunha 130 ap 74

Saúde

São Paulo – SP

Brazil

ZIPCODE: 04140-040

Telephone: 55 11 35783413 Fax: 55 11 55737820

e-mail: analirani@hotmail.com or analirani@fcr.epm.br

Abstract

Low Intensity Electrical Stimulation (LIES) has been used for bone repair but little is known about its effects on bone after menopause. Osteocytes probably play a role in mediating this physical stimulus and they could act as transducers through the release of biochemical signals, such as nitric oxide (NO). The aim of the present study was to investigate the effects of LIES on bone structure and remodeling, NOS expression and osteocyte viability in ovariectomized (OVX) rats. Thirty rats (200-220g) were divided into 3 groups: SHAM; OVX and OVX subjected to LIES (OVX+LIES) for 12 weeks. Following protocol, rats were sacrificed and tibias were collected for histomorphometric analysis and immunohistochemical detection of endothelial NO synthase (eNOS), inducible NOS (iNOS) and osteocyte apoptosis (caspase-3 and TUNEL). OVX rats showed significant ($p < 0.05$ vs SHAM) decreased bone volume (10% vs 25%) and trabecular number (1.7 vs 3.9), and increased eroded surfaces (4.7% vs 3.2%) and mineralization surfaces (15.9% vs 7.7%). In contrast, after LIES, all these parameters tended to be similar to SHAM and significantly different from OVX. eNOS and iNOS were: similarly expressed in subperiosteal regions of tibiae cortices of SHAM, not expressed in OVX and similarly expressed in OVX+LIES when compared to SHAM. In OVX, the percentage of apoptotic osteocytes (24%) was significantly increased when compared to SHAM (11%) and OVX+LIES (8%). Our results suggest that LIES counteracts some effects of OVX on bone tissue preserving bone structure and microarchitecture, iNOS and eNOS expression and osteocyte viability.

Keywords: Electrical Stimulation, Bone Architecture, Ovariectomy, Nitric Oxide, Osteocyte.

Introduction

Bone formation markers are augmented in postmenopausal osteoporotic women submitted to pulsed electrical magnetic fields, as shown by the increase on osteocalcin and pro-collagen type I C-terminal peptide levels [1]. Low Intensity Electrical Stimulation (LIES) has been used for bone repair for 3 decades, especially in pseudarthrosis and bone non-union [2], but little is known about its effects on bone metabolism after menopause. We have previously shown that LIES was able to prevent the effects of ovariectomy (OVX) on bone mineral density (BMD) in rats [3]. Osteocytes are the cells that probably mediate this physical stimulus and control bone turnover. The osteocytes are embedded in bone matrix and are connected to each other, to other bone cells and to bone surfaces through a network created by their cytoplasmatic processes. They have been suggested to act as mechanosensors and transducers [4] through the release of biochemical signals, which may modulate the bone remodeling. These factors remain unknown but nitric oxide (NO) has been hypothesized to play a role in the modification of bone turnover in response to mechanical loading. NO is produced by 3 distinct isoforms of NO synthase (NOS). The endothelial NOS (eNOS) is the predominant isoform in bone and is strongly expressed in osteocytes and chondrocytes [5,6,7]. The neuronal NOS (nNOS) is also expressed in osteocytes [5] and inducible NOS (iNOS) has been observed in osteoclasts, osteocytes and chondrocytes [6,8] in response to mechanical strain.

In vitro studies have shown that physical stimulus such as mechanical strain, pulsating fluid flow and LIES induces the release of NO by osteocytes [7,9], MC3T3-E1 cells [10] and human osteoblasts [11,12]. It has also been shown that unloading induces bone loss in iNOS knockout and wild-type animals, but the recovery after re-loading was only observed in wild-type animals [8].

In addition, NO has been suggested to mediate the effects of estrogen on bone. Estrogen stimulates eNOS activity in osteoblastic cells [13] and the effects of estrogen on bone formation are blunted in eNOS knockout mice [14]. Another study has shown that eNOS may limit ovariectomy-induced increased bone remodeling [15]. Several studies have shown that NO may counteract the effects of OVX [16,17]. In contrast, Cuzzocrea and coll. [18] showed that iNOS plays a major role in bone loss induced by estrogen depletion.

Thus, NO has been suggested to be a regulator of bone metabolism by mediating the effects of estrogen [7,16,18], mechanical stimulation [7,8], pulsating fluid flow [9,10] and shear stress [11].

Most of the previous studies have analyzed the effects of mechanical stimulation on either bone structure, NO synthesis or osteocyte apoptosis. The purpose of the present study was to investigate the effects of LIES on bone structure and remodeling, NOS expression and osteocyte viability in OVX rats. For that purpose we analyzed the effects of LIES on bone tissue of OVX rats by histomorphometry, on the expression of iNOS and eNOS and on osteocyte apoptosis by immunostaining.

Materials and Methods

Animals and Treatments

Thirty 12-weeks old Wistar female rats (200-220g) were subjected to anesthesia (Xilazin, Syntec®, 20 mg/kg and Ketamin, Agener®, 40 mg/Kg, IP) for bilateral ovariectomy (n=20, OVX) or sham operation (n=10, SHAM) according to the method described in Osteoporosis Study by Giardino and coll. [19]. Ten OVX rats (OVX+LIES) received a low intensity pulsed electrical field treatment (output power: 30 mW, tension: 40 V peak-to-peak, frequency: 1.5 MHz, duty cycle: 1:4), twenty minutes per day, 5 times-

a-week, starting on the 7th day after surgery, for a total of 12 weeks. Electrical field stimulation equipment was set in the electronics laboratory of Bioengineering Department (University of Sao Paulo, Sao Carlos, SP, Brazil). Metallic electrodes (size 30x 21 cm) were positioned on the superior and inferior parts of the cage (16 cm apart from each other) in order to submit the whole body of the rats to this low intensity electrical field through capacitive coupling, and not causing any discomfort to the animals. The electronic unit and the dosage parameters were similar to low intensity pulsed ultrasound, which is approved by American Food and Drug Administration to accelerate bone healing [2]. Animals were kept in cages under appropriated conditions of light and temperature (alternated cycles of 12 hours and temperature around 25°C) and had water and food *ad libitum*. After 12 weeks of experiments, all animals received 20mg/kg of tetracycline intraperitoneally (Terramicina, Pfizer, Sao Paulo, Brazil), on the 11th and 10th days (first labeling) and 5th and 4th days (second labeling) before sacrifice. The double tetracycline labeling was used for the analysis of the dynamic parameters of bone formation. This study was approved by the Committee of Ethics in Animal Research at the School of Medicine of Federal University of São Paulo, Brazil, under protocol number 0530/06.

Sample Preparation

On the day of sacrifice, right tibiae were collected for bone histomorphometry. They were dissected and the proximal segment was fixed in 70% ethanol, dehydrated, embedded in methylmetacrylate, and sectioned longitudinally using a Polychrome S microtome (Reichert-Young, Heidelberg, Germany). Five µm-thick sections of the specimens were stained with 0.1% toluidine blue at pH 6.4 and unstained sections were prepared for the observation under ultraviolet light. At least two non-consecutive stained and unstained sections were examined for each sample. The left tibiae were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) for three to four days before decalcification in 16% EDTA (pH

7.4) for 22 days. Following decalcification, the proximal half of tibia was embedded in paraffin. Seven-micron-thick sections of the proximal tibiae were cut longitudinally and used for the detection of NOS and apoptosis by immunohistochemistry.

Histomorphometry [20]

The abbreviations of histomorphometric parameters used were derived from the standard nomenclature of the ASBMR Committee [21]. Parameters of bone structure, microarchitecture and connectivity were measured by using an automatic image analyser (Bone, Explora Nova, La Rochelle, France) equipped with an Optronics Microfre digital camera and were obtained with Bone and MorphoExpert softwares (Explora Nova, La Rochelle, France) specific for bone histomorphometry: bone volume which expressed the percentage of the cancellous area occupied by bone tissue (BV/TV, %), trabecular thickness (Tb.Th, μm), trabecular separation (Tb.Sp, μm), trabecular number (Tb.N, /mm) derived from area and perimeter measurement according to Parfitt's formulae [22] and number of nodes (N.Nd/TV). The parameters reflecting bone remodeling were measured by using a semiautomatic method (Osteometrics Inc., Atlanta, GA) and included: the osteoid volume as a percentage of bone volume (OV/ BV, %), the osteoid surface as a percentage of bone surface (OS/ BS, %), the osteoblast surface as a percentage of bone surface (Ob.S/ BS, %), the eroded surface as a percentage of bone surface (ES/ BS, %). The dynamic parameters were: mineral apposition rate (MAR) and mineralizing surface/bone surface (MS/BS) calculated as double + $\frac{1}{2}$ single labeled surfaces. Bone formation rate/bone surface (BFR/BS) was calculated as (MS/BS) \times (MAR).

NOS immunostaining

Immunohistochemistry was performed on one paraffin-embedded section using a rabbit polyclonal antibody to eNOS and on another section using rabbit polyclonal antibody to iNOS (Abcam, Cambridge, MA) for each animal. Immunostaining was performed according to the method previously described by Basso and Heersche [23]. Briefly, deparaffinized sections were incubated in glycine for 20 minutes and in 0.2g of Trypsin 250, 0.2g of calcium chloride and 1M sodium hydroxide in TBS for 30 minutes. After that, sections were incubated in peroxidase blocking (Dakocytomation Envision® + system HRP, for use with rabbit primary antibody, code K4010, Carpinteria, USA) for 15 minutes and blocking solution for 20 minutes. Sections were then incubated in the primary antibody (1:100) in a humidity chamber overnight at +4°C. The next day, sections were washed with TBS containing 0.1% Tween-20 (TBS-Tw) and incubated with a goat anti-rabbit at room temperature for 25 minutes. Negative controls were incubated in buffer without secondary antibody. Sections were washed again with TBS-Tw and peroxidase activity was detected using DAB. Sections were counterstained with Mayer's haematoxylin, dehydrated, cleared and mounted with Eukitt. NOS-positive cells regions were evaluated on cortical and trabecular bone of metaphysis and diaphysis with a semi-quantitative method with a three point scale (absent, + or ++).

Apoptosis Assays

Both Caspase-3 and TUNEL techniques were performed in this study in order to confirm the localization of apoptotic cells. Briefly, caspase technique detects total caspase-3 activity, which is part of a family of molecules that are mediators of apoptosis, and caspase-3 has been shown to be one of the major activated caspases present in apoptotic cells, suggesting that it plays a prominent role in the cell death process [24]. TUNEL, the

method of TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, detects DNA breaks for in situ identification of programmed cell death [25].

Caspase

The protocol was adapted from Follet and coll. [26]. Sections were washed in 100% methanol, 70% methanol, PBS and PBS + 0.3% Triton X-100. Endogenous peroxidase was inactivated by incubating sections in 3% H₂O₂ in methanol for 5 minutes for total caspase-3. After that, incubation in 1.5% goat serum blocking solution (VectaStain ABC Kit) in PBS was performed for 30 minutes. Primary antibody (Caspase-3 (H-277), sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, USA) was diluted in PBS + 0.3% Triton X-100 + 0.1% bovine serum albumin (BSA). Caspase was used at a 1:25 dilution. Sections were incubated overnight at +4°C and washed 4 to 5 times in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tw). Sections were then incubated in goat anti-rabbit secondary antibody for 45 minutes and washed several times in PBS-Tw. Detection of peroxidase activity was performed with DAB. Sections were then counterstained with methyl green, dehydrated, cleared and mounted with Eukitt.

TUNEL

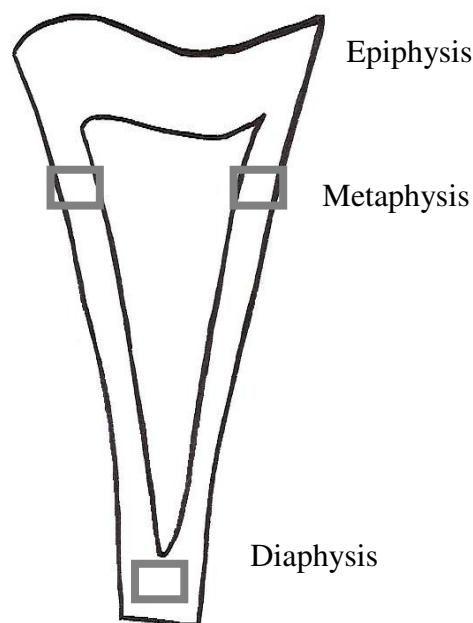
Klenow FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem, Germany) was used. Sections were incubated in 2mg/ml Proteinase K 1:100 in 10 mM Tris pH 8 for 20 minutes and washed in TBS. Positive control was incubated with 1µg/ml Dnase I in 1X TBS/1 mM MgSO₄ for 20 minutes and rinsed with TBS. For the inactivation of endogenous peroxidases, specimens were kept in 30% H₂O₂ 1:10 in methanol for 5 minutes. Sections were then incubated in Klenow equilibration buffer (1:10 with dH₂O) for 20 minutes, followed by Klenow labeling reaction mixture at 37°C for 1.5 hours, Stop Buffer for 5 minutes and Blocking Buffer for 10 minutes, both at room temperature. Detection of peroxidase activity was performed with DAB, for 10 to 15 minutes. Sections

were then washed with dH₂O, counterstained with methyl green, dehydrated, cleared and mounted with Eukitt.

Count of apoptotic cells

Two sections per animal (1 TUNEL and 1 caspase) were examined by light microscopy at 400x magnification. Measurements were performed on 3 distinct areas: on each cortex in the proximal part of the metaphysis and on the diaphysis cortex in the central area of the tibia (Fig. 1). Each tissue area analyzed was 62.5 mm². For the apoptotic cells, positively stained (apoptotic) osteocytes, negatively stained (alive) osteocytes, empty lacunae and the total number of lacunae were counted in each field using the Exploranova Morphoexpert (Explora Nova, La Rochelle, France), and their densities were expressed in percent of total number of lacunae. All the immunostaining analysis (eNOS, iNOS, TUNEL and Caspase) were performed by the same investigator, who was blinded to the treatment of all samples.

Figure 1. Measurement areas for apoptotic cells count on sections of female rats tibiae. (size of each analyzed tissue area = 62.5 mm²).



Statistics

Results were expressed as mean \pm SD. Non parametric tests were performed. The comparisons between 3 groups were performed by a Kruskal-Wallis test. If the difference was significant, the comparison between 2 groups was made by Mann-Whitney U test. Significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Bone histomorphometry

Twelve weeks of ovariectomy in rats induced a significant bone loss with a deterioration of trabecular architecture as shown by the decreased BV/TV, NdN/TV, TbN and increased TbSp (Table 1) compared to SHAM. These alterations resulted from an augmentation of the bone resorption and bone turnover as reflected by the increased ES/BS, MS/BS and BFR/BS (Table 2). In contrast, after LIES, all these parameters tended to be similar to SHAM values suggesting that LIES was able to prevent the effects of OVX.

Table 1. Bone histomorphometry of female rats tibiae: parameters of structure, microarchitecture and connectivity.

	SHAM	OVX	OVX+LIES
BV/TV (%)	24.8 \pm 8.2	10.2 \pm 2.5*#	22 \pm 11
TbTh (μm)	61.7 \pm 8.1	58.7 \pm 7.6	60 \pm 6.5
Tb N	3.93 \pm 0.9	1.72 \pm 0.3*#	3.69 \pm 1.8
Tb Sp (μm)	212 \pm 95.3	535.6 \pm 98*#	298.5 \pm 201.4
Nd.N/TV (/mm²)	9.59 \pm 4.7	3.65 \pm 1.2*	4.27 \pm 2.3

* $p < 0.05$ vs SHAM and # $p < 0.05$ vs OVX+LIES

Table 2. Bone histomorphometry of female rats tibiae: parameters of remodeling.

	SHAM	OVX	OVX+LIES
OV/BV (%)	0.86±1	0.43±0.7	0.66±0.5
OS/BS (%)	6.96±3.5	5.15±6.7	7.2±3.9
Ob.S/BS (%)	1.32±0.6	0.6±0.6	0.86±0.7
ES/BS (%)	3.25±1.7	4.7±1.7*#	3.33±2.3
MAR (um/d)	1.88±0.5	2.5±1.4	1.31±0.7
MS/BS (%)	7.70±2.9	15.92±7.9*#	7.69±6.6
BFR/BS	0.15±0.1	0.47±0.4#	0.12±0.1

*p<0.05 vs SHAM and #p<0.05 vs OVX+LIES

NOS expression

Both eNOS and iNOS were similarly expressed in subperiosteal regions of the cortices of metaphysis and diaphysis of tibiae of the SHAM group. eNOS and iNOS expressions were found in cortical bone, around osteocytes (Fig. 2-I). However, after 12 weeks of ovariectomy, no expression of any of these two NOS isoforms was detected (Table 3 and Fig. 2-I). In the group OVX+LIES, similar expressions of eNOS and iNOS were detected in the cortical bone of tibiae diaphysis, but there were slightly less stained regions (with positive cells) when compared to SHAM. With this method, we were not able to visualize eNOS nor iNOS expression on osteoblasts, osteoclasts, trabecular bone and medullae in any of the groups.

Table 3. Semi-quantitative analysis of the expression of eNOS and iNOS on female rats tibiae.

	eNOS	iNOS
SHAM	++ (cortical subperiosteal region metaphysis/diaphysis)	++ (cortical subperiosteal region metaphysis/diaphysis)
OVX	-	-
OVX+LIES	+ (distal cortical diaphysis)	+ (distal cortical diaphysis)

Apoptosis

After immunostaining for cleaved caspase-3 and the label of DNA fragmentation by TUNEL staining, strongly positive chondrocytes and osteocytes were present in cortical bone. In OVX rats, the percentage of apoptotic osteocytes was increased, and this difference was significant when compared to OVX+LIES group with caspase technique and compared to SHAM with TUNEL technique (Table 4). The percentage of viable cells in OVX group was significantly decreased but the percentage of empty lacunae was significantly increased when compared to both SHAM and OVX+LIES groups (Table 4 and Fig. 2-II-III). LIES was able to significantly prevent the increase in both apoptotic osteocytes and empty lacunae.

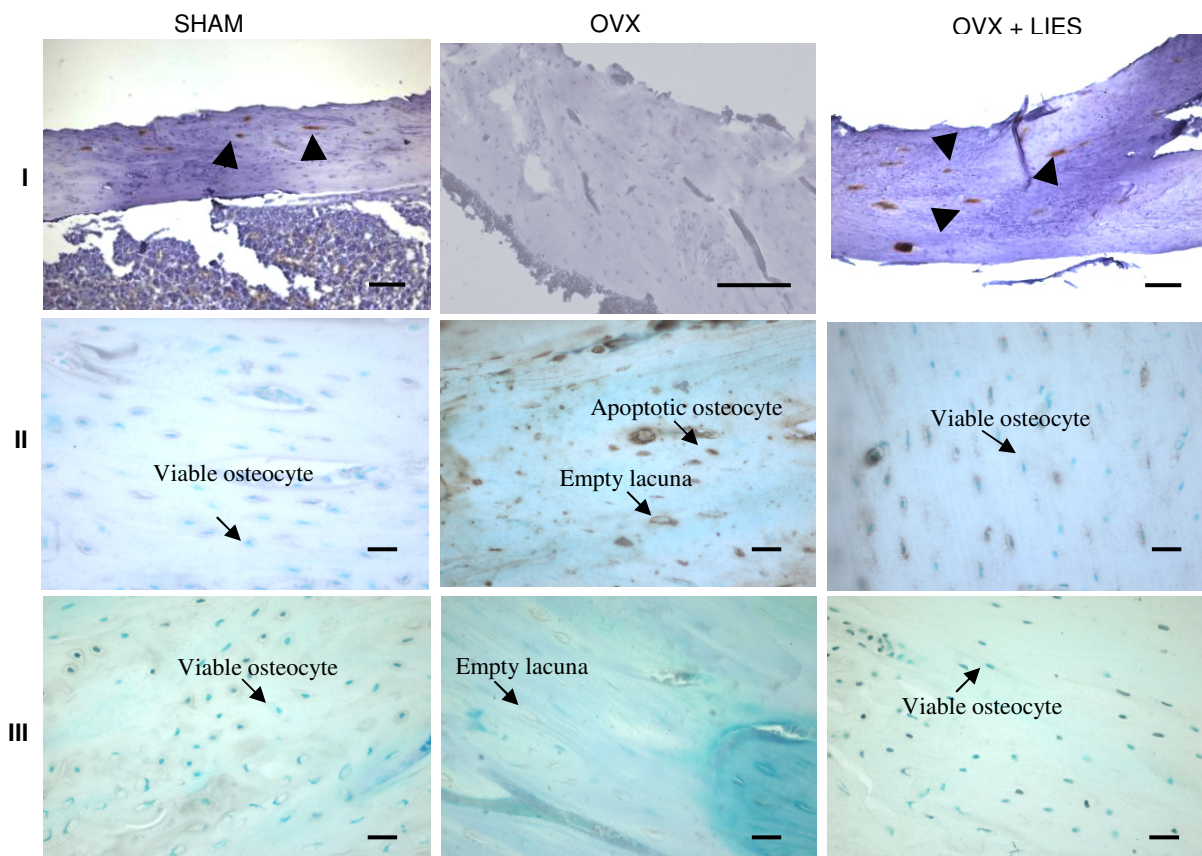
Table 4. Effects of ovariectomy (OVX) and low intensity electrical stimulation (LIES) on osteocyte viability.

	SHAM	OVX	OVX+LIES
<i>Caspase-3 technique</i>			
Viable osteocytes (%)°	82.4±9.4	13.3±9.5*#	83.8±9
Apoptotic osteocytes (%)°	11.4±8.2	24.2±15.5#	8.2±7.6
Empty lacunae (%)°	6.2±3.5	62.5±15.9*#	8.0±5.6
Total number lacunae (/mm ²)	556.4±102	306.4±129*#	493.5±123
<i>TUNEL technique</i>			
Viable osteocytes (%)°	84.7±11.5	46.3±14.7*#	79.5±12.1
Apoptotic osteocytes (%)°	8.1±8.6	17.9±3.4*	10.8±9.1
Empty lacunae (%)°	7.2±5.3	35.8±17.4*#	9.7±7.2
Total number lacunae (/mm ²)	591.4±123	384.4±77*	514.5±100

°expressed in percent of the total number of lacunae.

*p<0.05 vs SHAM and #p<0.05 vs OVX+LIES.

Figure 2. Expression of eNOS (I) and detection of the osteocyte apoptosis by caspase-3 immunostaining (II) and TUNEL (III) on the tibia of female rats. Arrow head: regions with eNOS positive cells. Similar observations were made with iNOS immunostaining. Bar = 100 µm (I) and 20 µm (II and III).



Discussion

Osteocytes probably orchestrate skeletal adaptation to mechanical stimuli and NO has been hypothesized to mediate both effects of mechanical loading and estrogens on bone. Osteocytes produce NO in response to shear stress [9] and osteocyte apoptosis can be prevented by NO [27]. In addition, it has been shown that, in the presence of L-NAME - a NOS inhibitor, estrogen is totally ineffective in reversing bone loss in OVX rats, suggesting that the protective effect of estrogens against bone loss may be mediated through NO [16]. So, in this study, we investigated the influence of LIES on bone structure and remodeling, eNOS and iNOS expressions and on osteocyte survival in OVX rats.

Our findings confirmed that OVX induced bone loss and microarchitecture deterioration in consequence to an increase in resorption and bone turnover as shown by ES/BS, MS/BS and BFR/BS. Moreover, OVX rats showed an increased percentage of apoptotic osteocytes (109%) and empty lacunae (506%), when compared to SHAM. Others [28] have cited that 3 weeks of ovariectomy may cause a 400% increase in osteocyte apoptosis in tibiae of rats, but no data was found in literature about the effects of 12 weeks of OVX on osteocyte survival. Aguirre and coll. [29] showed that unloading also augments osteocyte apoptosis in mice, and that this change was followed by increased osteoclast number and cortical porosity, reduced trabecular and cortical width, and decreased spinal BMD and vertebral strength. These authors suggested that dying osteocytes are the signals for osteoclast recruitment in their surrounding area and the resulting increase in bone resorption and bone loss. Besides, it is known that the augmented bone fragility which results from glucocorticoids use [30, 31], and both estrogen [32] and androgens deficiencies [33] is also associated to a higher prevalence of osteocyte apoptosis.

Our study also demonstrated that OVX rats expressed neither eNOS nor iNOS 12 weeks after surgery, while SHAM rats expressed eNOS and iNOS mainly on the

subperiosteal regions of the cortices of tibial metaphysis and diaphysis. These findings suggested that eNOS and iNOS expressions were modulated by estrogen, and are in agreement with previous studies which showed that the effects of OVX depend on NOS expression [15, 16, 34]. In contrast, Cuzzocrea and coll. [18] concluded that iNOS could mediate the bone loss induced by OVX in mice. However, *in vitro* studies corroborated the positive effect of estrogen on eNOS activity [13].

Exposure to LIES prevented most of the effects of OVX on bone. Bone turnover and resorption parameters were similar to those in SHAM animals and LIES was able to preserve bone structure and microarchitecture, but not bone connectivity (Nd.N/TV) in this bone loss model. This was in agreement with previous results showing that BMD was maintained in OVX rats [3] or increased after fracture in rabbits [35] submitted to LIES or to pulsed electromagnetic fields [36]. These effects of LIES on bone structure and microarchitecture were associated to the maintenance of osteocyte viability and NOS expression.

In the present study, LIES prevented the augmentation of osteocyte apoptosis caused by OVX, keeping OVX+LIES group with similar levels of osteocyte survival as in SHAM group. As far as we know, there are no other studies about the effects of LIES on osteocyte survival, but our results are in agreement with the positive effects of mechanical stimulation on osteocyte viability, which have already been shown in animals [37] as well as in humans [38]. Mechanical stimulus may reduce the expression of Bcl-2 [39], an anti-apoptotic gene product, as well as inhibit osteoclasts formation and bone resorption in chicken calvaria cells *in vitro* [27]. Besides, Mann and coll. [38] showed that mechanical stimulus prevents osteocyte apoptosis and increases bone formation rate (BFR/BS) and alkaline phosphatase concentration on the surface of human trabecular bone. The signal transduction pathway between mechanical stimulation and the inhibition of osteocyte

apoptosis remains poorly understood but it is likely that the Wnt/beta-catenin pathway [40, 41] and NO [27] are involved.

We also showed that LIES could preserve eNOS and iNOS expressions on bone of the ovariectomized rats, which is in agreement with *in vitro* studies that demonstrate that electrical stimulation may increase NO synthesis on bone. *In vitro* studies have shown that NO released under pulsed electromagnetic fields [42] and pulsating fluid flow [43] stimulates osteoblastic differentiation and proliferation. Interestingly, NO was found to increase osteoprotegerin and decrease osteoclastogenesis in bone marrow stromal cells from OVX rats [44, 45]. Hamed and coll. [12] have suggested that in human osteoblasts, LIES activated preferentially iNOS and that eNOS was activated by estrogen. However, in our experiments, similar expressions of iNOS and eNOS were observed in cortical bone of OVX rats after 12 weeks of LIES treatment. NO produced by iNOS has also been reported to play a major role on bone formation in response to reloading after tail suspension [8]. In a model of unloading in rats, Basso and Heersche [23] observed an augmentation in osteocyte apoptosis, osteoclast number and a decreased bone mass which returned to baseline values after reloading, simultaneously with marked augmentations of iNOS and eNOS. Thus we have shown that the bone changes induced by estrogen deficiency and LIES were associated to modifications of NOS expression but we cannot exclude that other factors and pathways may be involved.

Huang and coll. [46] recently suggested that osteocytes are the sensory cells that capture electrical stimulation signals and translate them into biochemical signals; these signals would then be transferred through the dendritic processes of osteocytes to the effector cells such as osteoblasts and osteoclasts to initiate bone formation. In agreement with this, we hypothesize that LIES preserved osteocyte viability and NOS expression which could secondarily act on bone remodeling.

In conclusion, our results suggest that low intensity electrical stimulation may counteract some effects of OVX on bone tissue. It was shown for the first time that LIES was able to preserve bone structure and microarchitecture, iNOS and eNOS expression and osteocyte viability on bone of OVX rats. Further investigations are now needed to determine whether these factors are all connected in the same mechanism of the response of bone tissue to electrical stimulation.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Helene Follet for caspase technique, Delphine Goehrig for immunohistochemistry and Vanda Jorgetti for histomorphometry support. This study was supported by CAPES and CNPq (Brazil).

References

- [1] Giordano N, Battisti E, Geraci S, Fortunato M, Santacroce C, Rigato M, Gennari L, Gennari C (2001). Effect of electromagnetic fields on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in osteoporosis: a single-blind, randomized pilot study. *Current Therapeutic Research* 62(3): 187-193.
- [2] Lind M, Bünger C (2001). Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J.* 10 Suppl 2:S102-9.
- [3] Lirani-Galvão APR, Bergamaschi CT, Silva OL, Lazaretti-Castro M (2006). Electrical Field Stimulation Improves Bone Mineral Density in Ovariectomized Rats. *Braz J Med Biol Res.* 39(11):1501-5.
- [4] Burger EH, Klein-Nulend J (1999). Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res.* 13:93-8.

- [5] Caballero-Alías AM, Loveridge N, Lyon A, Das-Gupta V, Pitsillides A, Reeve J (2004). NOS isoforms in adult human osteocytes: multiple pathways of NO regulation?. *Calcified Tissue International* 75:78-84.
- [6] Van't Hof RJ, Ralston SH (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology* 103(3):255-61.
- [7] Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC et al (1999). Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res* 14: 1123-31.
- [8] Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T (2002). Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 17(6):1015-25.
- [9] Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH (1995). Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 217(2):640-8.
- [10] Mullender MG, Dijcks SJ, Bacabac RG, Semeins CM, Van Loon JJ, Klein-Nulend J (2006). Release of nitric oxide, but not prostaglandin E2, by bone cells depends on fluid flow frequency. *J Orthop Res* 24(6):1170-7.
- [11] Bakker AD, Klein-Nulend J, Tanck E, Albers GH, Lips P, Burger EH (2005). Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos Int* 16(8):983-9.
- [12] Hamed A, Kim P, Cho M (2006). Synthesis of nitric oxide in human osteoblasts in response to physiologic stimulation of electrotherapy. *Ann Biomed Eng.* 34(12):1908-16.
- [13] Armour KE, Ralston SH (1998). Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 139(2):799-802.

- [14] Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Gödecke A, Helfrich MH, Reid DM, Ralston SH (2001). Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 142(2):760-6.
- [15] Grassi F, Fan X, Rahnert J, Weitzmann MN, Pacifici R, Nanes MS, Rubin J (2006). Bone re/modeling is more dynamic in the endothelial nitric oxide synthase(-/-) mouse. *Endocrinology* 147(9):4392-9.
- [16] Wimalawansa SJ, De Marco G, Gangula P, Yallampalli C (1996). Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone* 18(4):301-4.
- [17] Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, Girgis SI, Kontinen YT, Goodship AE, MacIntyre I, Polak JM (2003). Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone* 32:142-149.
- [18] Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, Vegeto E, Caputi AP, Van De Loo FA, Puzzolo D, Maggi A (2003). Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* 144(3):1098-107.
- [19] Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Mongiorgi R, Gnudi S, Zati A (1993). Experimental surgical model in osteoporosis study. *Boll Soc Ital Biol Sper* 69(7-8):453-60.
- [20] Chavassieux P, Arlot M, Meunier P (2001). Clinical use of bone biopsy. In: *Osteoporosis Second Edition Volume 2*, Marcus R, Feldman D, Kelsey J. eds., Academic Press, San Diego, USA, 501-509.
- [21] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2(6):595-610.
- [22] Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS (1983). Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and

in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest.* 72(4):1396-409.

[23] Basso N, Heersche JN (2006). Effects of hind limb unloading and reloading on nitric oxide synthase expression and apoptosis of osteocytes and chondrocytes. *Bone* 39(4):807-14.

[24] Faleiro, L., R. Kobayashi, H. Fearnhead, and Y. Lazebnik (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO* 16:2271-2281.

[25] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119(3):493-501.

[26] Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB (2007). Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 40(4):1172-7.

[27] Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, Everts V, Klein-Nulend J (2006). Fluid shear stress inhibits TNFalpha-induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res* 85(10):905-9.

[28] Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS (1998). The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res.* 13(8):1243-50.

[29] Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T (2006). Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 21(4):605-15.

[30] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by

glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102(2):274-82.

[31] Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 18(10):1319-28.

[32] Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS (1997). The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82(9):3128-35.

[33] Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104(5):719-30.

[34] Samuels A, Perry MJ, Gibson RL, Colley S, Tobias JH (2001). Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* 29(1):24-29.

[35] Wang CJ, Yang KD, Wang FS, Hsu CC, Chen HH (2004). Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone* 34(1):225-30.

[36] Chang K, Chang WH (2003). Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: a prostaglandin E₂-associated process. *Bioelectromagnetics* 24(3):189-198.

[37] Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE (2003). Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284(4):C934-43.

- [38]. Mann V, Huber C, Kogianni G, Jones D, Noble B (2006). The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 6(4):408-17.
- [39] Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E (2004). Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320: 1163-68.
- [40] Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, Bex FJ (2006). Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 281(42):31720-8.
- [41] Bonewald LF, Johnson ML (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42(4):606-15.
- [42] Diniz P, Soejima K, Ito G (2002). Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 7:18-23.
- [43] Vezeridis PS, Semeins CM, Chen Q, Klein-Nulend J (2006). Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 348(3):1082-8.
- [44] Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, Rosen C, Nanes MS, Rubin J (2004). Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 145(2):751-9.
- [45] Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, Huang YT, Huang HC, Chang PR, Sun YC, Yang KD (2004). Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Endocrinology* 145(5):2148-56.

[46] Huang CP, Chen XM, Chen ZQ (2008). Osteocyte: the impresario in the electrical stimulation for bone fracture healing. *Med Hypotheses* 70(2):287-90.

ARTIGO 3

Low Intensity Electrical Stimulation Effects are Related to Nitric Oxide Pathway in Ovariectomized Rat Bone Tissue

Lirani-Galvao APR, Chavassieux P, Portero-Muzy N, Bergamaschi CT, Silva OL,
Carvalho AB, Delmas P, Lazaretti-Castro M.

Abstract

We have previously shown that low intensity electrical stimulation (LIES) may counteract the effects of ovariectomy (OVX) on bone structure and microarchitecture NOS expression and osteocyte viability in rats (Lirani-Galvao et al., *Calcif Tissue Int.*, 2008). Osteocytes have been hypothesized to mediate these effects by releasing biochemical signals such as nitric oxide (NO). The aim of the present study was to investigate if the known effects of LIES on bone of OVX rats could be mediated by NO. Sixty rats (200-220g) were divided into 6 groups: SHAM; SHAM treated with 6mg/d of L-NAME, an inhibitor of NO synthase (SHAM-L-NAME); ovariectomized (OVX); OVX treated with L-NAME (OVX-L-NAME) or subjected to an electrical stimulation (OVX-LIES) or both (OVX-LIES-L-NAME) for 12 weeks. After double tetracycline labelling, rats were sacrificed and tibias were collected for histomorphometric analysis. Osteocyte apoptosis (caspase-3 and TUNEL) and expressions of endothelial NO synthase (eNOS) and inducible NOS (iNOS) were assessed by immunostaining. LIES was not able to prevent the reduction of BV/TV and TbN caused by OVX in the presence of L-NAME (OVX-L-NAME vs OVX-LIES-L-NAME), as it did in the absence of this NO inhibitor. However, L-NAME did not block the effects of LIES on bone resorption (ES/BS and OCS/BS) of OVX rats. SHAM-L-NAME and OVX-L-NAME showed a diminished percentage of apoptotic osteocytes when compared to SHAM and OVX, respectively, but this difference was not observed between

OVX-LIES-L-NAME and OVX-LIES. eNOS and iNOS expressions were not detected on bone of none of L-NAME treated groups, including the OVX-LIES-L-NAME group. In conclusion, our study showed that L-NAME partially blocks the effects of LIES on bone structure (but not on bone resorption) and on iNOS and eNOS expressions in OVX rats, suggesting that NO may be a mediator of the positive effects of LIES on bone. However, it was not possible to identify if the known positive effects of LIES on osteocyte viability were mediated by NO, since the effects of L-NAME on these cells were similar to those caused by LIES.

key-words: Electrical Stimulation, Nitric Oxide, Bone Architecture, Ovariectomy, Osteocyte.

Introduction

Osteocytes have been suggested to act as mechanosensors, transducers (Burger and Klein-Nulend, 1999) and mediators of physical stimuli (Ma et al., 2008) through the release of biochemical signals, which may modulate bone remodelling. These factors remain unknown but nitric oxide (NO) has been hypothesized to play a role in the modification of bone turnover in response to mechanical loading.

NO participates in the regulation of many biological functions in nervous, vascular and immune systems (Moncada et al., 1991), and it was found to be an important regulator of bone formation (Koyama et al., 2000) and resorption (Zheng et al., 2005). Endothelial NO synthase (eNOS) is the prevailing isoform expressed by cells of the osteoblast/osteocyte lineage and strain may increase its activity (Zaman et al., 1999). Inducible NO synthase (iNOS) was found to act in bone as an autocrine negative feedback signal to limit osteoclastogenesis concurrently stimulated by RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand) (Zheng et al., 2006).

NO has been suggested to be a regulator of bone metabolism by mediating the effects of estrogen (Zaman et al., 1999, Wimalawansa, 1996, Cuzzocrea et al., 2003), mechanical stimulation (Zaman et al., 1999, Watanuki et al., 2002), pulsating fluid flow (Klein-Nulend et al., 1995, Mullender et al., 2006, Tan et al., 2008) and shear stress (Bakker et al., 2005), inducing the release of NO by osteocytes (Zaman 1999, Klein-Nulend et al. 1995), MC3T3-E1 cells (Mullender et al., 2006) and human osteoblasts (Bakker et al., 2005; Hamed et al. 2006).

Some investigations have shown that NO may counteract the effects of ovariectomy (OVX) (Wimalawansa et al. 1996, Hukkanen et al. 2003). Besides, a randomized NIH-funded NOVEL clinical study is currently assessing the effectiveness of topically administered nitroglycerine (a NO donor) in the prevention of postmenopausal bone loss (Wimalawansa, 2007).

We have previously shown that low intensity electrical stimulation (LIES) may counteract the effects of OVX on bone mineral density (BMD) (Lirani-Galvão et al., 2006), NOS expression, osteocyte viability, bone structure and microarchitecture in rats (Lirani-Galvao et al., 2008¹). We hypothesized that the preserved osteocyte viability and activation of iNOS and eNOS could secondarily act on the osteoclasts-osteoblasts to maintain bone structure and microarchitecture.

The aim of the present study was to investigate if the known effects of LIES on bone of OVX rats could be mediated by NO. Thus we analysed the effects of NO blockage (with L-NAME) in the response to LIES on osteocyte viability, bone structure and microarchitecture in OVX rats. For that objective we studied the effects of LIES with or without associated L-NAME treatment on bone tissue of OVX rats by histomorphometry, on the expression of iNOS and eNOS and on osteocyte apoptosis by immunostaining.

¹ Artigo 2 do presente trabalho, submetido à revista *Calcified Tissue International*.

Materials and Methods

Animals and Treatments

Sixty Wistar female rats (200-220g) were subjected to anesthesia (Xilazin (Syntec®), 20 mg/kg and Ketamin (Agener®), 40 mg/Kg, IP) for bilateral ovariectomy (n=40, OVX) or sham operation (n=20, SHAM) according to the method described in Osteoporosis Study by Giardino and cols (Giardino et al., 1993). SHAM-L-NAME, OVX-L-NAME and OVX-LIES-L-NAME (n=10 each) received daily 06 mg/Kg of L-NAME (N^ω-nitro-L-arginin methyl ester, Sigma Chemical Co., Germany) by gavage during the whole protocol period (12 weeks). This dose of L-NAME was chosen based on literature (da Cunha et al., 2004) with inhibitor effect of NOS without causing an exacerbated hypertension. Twenty rats (OVX-LIES and OVX-LIES-L-NAME) received a low intensity pulsed electrical treatment (output power: 30 mW, tension: 40 V peak-to-peak, frequency: 1.5 MHz, duty cycle: 1:4) in 60 sessions of twenty minutes, 5 times-a-week, starting on the 7th day after surgery, for 12 weeks (table 1).

Table 1 – Six groups of rats submitted to 12 weeks of protocol.

GROUP	SURGERY	TREATMENT
SHAM	SIMULATED	NONE
SHAM-L-NAME	SIMULATED	L-NAME
OVX	BILATERAL OVARIECTOMY	NONE
OVX L-NAME	BILATERAL OVARIECTOMY	L-NAME
OVX-LIES	BILATERAL OVARIECTOMY	ELECTRICAL STIMULATION
OVX-LIES-L-NAME	BILATERAL OVARIECTOMY	ELECTRICAL STIMULATION AND L-NAME

Electrical field stimulation equipment was set in the electronics laboratory of Bioengineering Department (University of Sao Paulo, Sao Carlos, SP, Brazil), as previously described by our group (Lirani-Galvão et al., 2006; Lirani-Galvão et al., 2008).

Metallic electrodes (size 25x 35 cm) were positioned on the superior and inferior parts of the cage in order to submit the whole body of the rats to this low intensity electrical field through capacitive coupling. Animals were kept in cages under appropriated conditions of light and temperature (alternated cycles of 12 hours and temperature around 25°C) and had water and food *ad libitum*. After 12 weeks of experiments, all animals received 20mg/kg of tetracycline intraperitoneally (Terramicina, Pfizer, Sao Paulo, Brazil), on the 11th and 10th days (first labeling) and 5th and 4th days (second labeling) before sacrifice. The double tetracycline labeling was used for the analysis of the dynamic parameters of bone formation. This study was approved by the Committee of Ethics in Animal Research at the School of Medicine of Federal University of São Paulo, Brazil, under protocol number 0530/06.

Sample Preparation

On the day of sacrifice, right tibiae were collected for bone histomorphometry. They were dissected and the proximal segment was fixed in 70% ethanol, dehydrated, embedded in methylmetacrylate, and sectioned longitudinally using a Polychrome S microtome (Reichert-Young, Heidelberg, Germany). Five µm-thick sections of the specimens were stained with 0.1% toluidine blue at pH 6.4 and unstained sections were prepared for the observation under ultraviolet light. At least two non-consecutive stained and unstained sections were examined for each sample. The left tibiae were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) for three to four days before decalcification in 16% EDTA (pH 7.4) for 22 days. Following decalcification, the proximal half of tibia was embedded in paraffin. Seven-micron-thick sections of the proximal tibiae were cut longitudinally and used for the detection of NOS and apoptosis by immunohistochemistry.

Histomorphometry (Chavassieux et al., 2001)

The abbreviations of histomorphometric parameters used were derived from the standard nomenclature of the ASBMR Committee (Parfitt et al., 1987). Parameters of bone structure, microarchitecture and connectivity were measured by using an automatic image analyser (Bone, Explora Nova, La Rochelle, France) equipped with a digital camera Microfire Optronic and were obtained with Bone and MorphoExpert softwares (Explora Nova, La Rochelle, France) specific for bone histomorphometry: bone volume which expressed the percentage of the cancellous area occupied by bone tissue (BV/TV, %), trabecular thickness (Tb.Th, μm), trabecular separation (Tb.Sp, μm), trabecular number (Tb.N, /mm) derived from area and perimeter measurement according to Parfitt's formulae (Parfitt et al., 1983) and number of nodes (N.Nd/TV). The parameters reflecting the bone remodeling were measured by using a semiautomatic method (Osteometrics Inc., Atlanta, GA) and included: the osteoid volume as a percentage of bone volume (OV/ BV, %), the osteoid surface as a percentage of bone surface (OS/ BS, %), the osteoblast surface as a percentage of bone surface (Ob.S/ BS, %), the eroded surface as a percentage of bone surface (ES/ BS, %) and the osteoclast surface as a percentage of bone surface (Oc.S/ BS, %). The dynamic parameters were: mineral apposition rate (MAR) and mineralizing surface/bone surface (MS/BS) calculated as double + $\frac{1}{2}$ single labeled surfaces. Bone formation rate/bone surface (BFR/BS) was calculated as $(\text{MS/BS}) \times (\text{MAR})$.

NOS immunostaining

Immunohistochemistry was performed on one paraffin-embedded section using a rabbit polyclonal antibody to eNOS and one rabbit polyclonal antibody to iNOS (Abcam, Cambridge, MA) for each animal. Immunostaining was performed according to the method previously described by Basso and Heersche (2006). Briefly, deparaffinized sections were

incubated in glycine for 20 minutes and in 0.2g of Trypsin 250, 0.2g of calcium chloride and 1M sodium hydroxide in TBS for 30 minutes. After that, sections were incubated in peroxidase blocking (Dakocytomation Envision® + system HRP, for use with rabbit primary antibody, code K4010, Carpinteria, USA) for 15 minutes and blocking solution for 20 minutes. Sections were then incubated in the primary antibody (1:100) and on the next day, sections were washed with TBS containing 0.1% Tween-20 (TBS-Tw) and incubated with a goat anti-rabbit at room temperature. Negative controls were incubated in buffer without secondary antibody. Sections were washed again with TBS-Tw and peroxidase activity was detected using DAB. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted with Eukitt. NOS-positive cells were evaluated on cortical and trabecular bone of metaphysis and diaphysis with a semi-quantitative method with a three point scale (absent, + or ++), as described elsewhere (Lirani-Galvao et al., 2008).

Apoptosis Assays

Both Caspase-3 and TUNEL techniques were performed in this study in order to confirm the localization of apoptotic cells. Briefly, caspase technique detects caspase-3 activity, which is part of a family of molecules that are mediators of apoptosis, and caspase-3 has been shown to be one of the major activated caspases present in apoptotic cells, suggesting that it plays a prominent role in the cell death process (Faleiro et al., 1997). TUNEL, the method of TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, detects DNA breaks for *in situ* identification of programmed cell death (Gavrieli et al., 1992).

Caspase

The protocol was adapted from Follet and cols (2007), and was described elsewhere (Lirani-Galvao et al., 2008). Briefly, sections were washed in 100% methanol, 70% methanol, PBS and PBS + 0.3% Triton X-100. Endogenous peroxidase was inactivated by

incubating sections in 3% H₂O₂ in methanol for 5 minutes for caspase-3. After that, incubation in 1.5% goat serum blocking solution (VectaStain ABC Kit) in PBS was performed for 30 minutes. Primary antibody (Caspase-3 (H-277), sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, USA) was diluted in PBS + 0.3% Triton X-100 + 0.1% bovine serum albumin (BSA). Caspase was used at a 1:25 dilution. Sections were incubated overnight at +4°C and washed 4 to 5 times in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tw). Sections were then incubated in goat anti-rabbit secondary antibody for 45 minutes and washed several times in PBS-Tw. Detection of peroxidase activity was performed with DAB. Sections were then counterstained with methyl green, dehydrated, cleared and mounted with Eukitt.

TUNEL

Klenow FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem, Germany) was used. Sections were incubated in 2mg/ml Proteinase K 1:100 in 10 mM Tris pH 8 for 20 minutes and washed in TBS. Positive control was incubated with 1µg/ml Dnase I in 1X TBS/1 mM MgSO₄ for 20 minutes and rinsed with TBS. For the inactivation of endogenous peroxidases, specimens were kept in 30% H₂O₂ 1:10 in methanol for 5 minutes. Sections were then incubated in Klenow equilibration buffer (1:10 with dH₂O) for 20 minutes, followed by Klenow labeling reaction mixture at 37°C for 1.5 hours, Stop Buffer for 5 minutes and Blocking Buffer for 10 minutes, both at room temperature. Detection of peroxidase activity was performed with DAB, for 10 to 15 minutes. Sections were then washed with dH₂O, counterstained with methyl green, dehydrated, cleared and mounted with Eukitt.

Count of apoptotic cells

Two sections per animal (TUNEL and caspase) were examined by light microscopy at 400x magnification. Measurements were performed on each cortex in the proximal part

of the metaphysis of and on the diaphysis cortex in the central area of the tibia (Fig. 1). Each tissue area analyzed was 62.5 mm². For the apoptotic cells, positively stained (apoptotic) osteocytes, negatively stained (alive) osteocytes, empty lacunae and the total number of lacunae were counted in each field using the Exploranova Morphoexpert (Explora Nova, La Rochelle, France), and their densities were expressed in percent of total number of lacunae.

Statistics

Results were expressed as mean \pm SD. Non parametric tests were performed. The comparisons between 6 groups were performed by a Kruskal-Wallis test. If the difference was significant, the comparison between 2 groups was made by Mann-Whitney U test. Significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Bone histomorphometry

As already described by our group (Lirani-Galvao et al., 2008), 12 weeks of ovariectomy in rats induced a significant bone loss with a deterioration of trabecular architecture as shown by the decreased BV/TV, Ndn/TV, TbN and increased TbSp compared to SHAM (table 2). In contrast, after LIES, except for Ndn/TV, all these parameters tended to be similar to SHAM values suggesting that LIES was able to prevent the effects of OVX.

After 12 weeks of treatment, L-NAME augmented TbN and Ndn/TV and decreased BFR/BS, MS/BS and MAR, when compared to SHAM (tables 2 and 3). In the presence of L-NAME, LIES was not able to increase BV/TV nor TbN on OVX rats (OVX-L-NAME vs OVX-LIES-L-NAME), as it did in the absence of this NO inhibitor. The

group OVX-LIES-L-NAME presented decreased ES/BS and OcS/BS when compared to OVX-L-NAME, demonstrating that L-NAME did not block the effects of LIES on these parameters.

Table 2 - Histomorphometry - Structure and Architecture Parameters

Groups	BV/TV (%)	TbTh (μm)	Tb N	Tb Sp (μm)	Nd.N/TV (/mm ²)
SHAM	24,84 \pm 8,2	61,71 \pm 8,1	3,93 \pm 0,9	212,02 \pm 95,3	9,59 \pm 4,7
SHAML-L-NAME	37,08 \pm 7,3	64,62 \pm 16,3	5,81 \pm 0,6 ^a	109,25 \pm 15,8	19,1 \pm 3,5 ^a
OVX	10,17 \pm 2,5 ^{ab}	58,69 \pm 7,6	1,72 \pm 0,3 ^{ab}	535,64 \pm 98 ^{ab}	3,65 \pm 1,2 ^a
OVX-L-NAME	14,09 \pm 7,6 ^c	58,03 \pm 7,9	2,32 \pm 1,0 ^c	475,06 \pm 296,7 ^c	3,52 \pm 2,1
OVX-LIES	21,97 \pm 11	60,03 \pm 6,5	3,69 \pm 1,8	298,50 \pm 201,4	4,27 \pm 2,3
OVX-LIES-L-NAME	15,81 \pm 9,7 ^c	63,63 \pm 7,4	2,40 \pm 1,2 ^c	441 \pm 232,1	6,85 \pm 7,6

^ap<0.05 vs SHAM, ^bp<0.05 vs OVX-LIES, ^cp<0.05 vs SHAM-L-NAME.

Table 3 - Histomorphometry - Remodeling Parameters

Groups	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	MS/BS (%)	BFR/BS
SHAM	0,86 \pm 1	6,96 \pm 3,5	1,32 \pm 0,6	3,25 \pm 1,7	1,77 \pm 0,8	1,88 \pm 0,5	7,70 \pm 2,9	0,15 \pm 0,1
SHAML-L-NAME	0,04 \pm 0	0,69 \pm 0,5	0,85 \pm 0,5	4,14 \pm 1,8	2,55 \pm 1,2	0,94 \pm 0,3 ^a	3,8 \pm 2,0 ^a	0,04 \pm 0,03 ^a
OVX	0,43 \pm 0,7	5,15 \pm 6,7	0,6 \pm 0,6	4,7 \pm 1,7 ^{ab}	2,93 \pm 1,3 ^a	2,5 \pm 1,4	15,92 \pm 7,9 ^{ab}	0,47 \pm 0,4 ^b
OVX-L-NAME	0,26 \pm 0,3	4,5 \pm 6,3	0,83 \pm 0,3	6,25 \pm 2,3 ^c	3,94 \pm 1,5 ^c	1,00 \pm 0,43	5,84 \pm 3,7	0,06 \pm 0,05
OVX-LIES	0,66 \pm 0,5	7,2 \pm 3,9	0,86 \pm 0,7	3,33 \pm 2,3	2,25 \pm 1,3	1,31 \pm 0,7	7,69 \pm 6,6	0,12 \pm 0,1
OVX-LIES-L-NAME	0,16 \pm 0,2	2,72 \pm 2,7	1,06 \pm 0,6	2,65 \pm 1,4	1,79 \pm 1,0	1,66 \pm 0,56	12,13 \pm 3,7	0,20 \pm 0,10

^ap<0.05 vs SHAM, ^bp<0.05 vs OVX-LIES, ^cp<0.05 vs OVX-LIES-L-NAME.

NOS expression

As we described elsewhere (Lirani-Galvao et al., 2008), both eNOS and iNOS were similarly expressed in subperiosteal regions of the cortices of metaphysis and diaphysis of tibiae of the SHAM group. eNOS and iNOS expressions were found in cortical bone, around osteocytes (fig 1). However, after 12 weeks of ovariectomy, no expression of any of these two NOS isoforms was detected (table 4). In the group OVX+LIES, similar expressions of eNOS and iNOS were detected in the cortical bone of tibiae diaphysis, when compared to SHAM. L-NAME blocked, as expected, both iNOS and eNOS expressions in SHAM-L-NAME after 12 weeks of treatment. The effect of LIES on iNOS and eNOS expressions of OVX rats was blocked by L-NAME (OVX-LIES-L-NAME

group), suggesting that NO could be a mediator of the bone effects of LIES on OVX rats. With this method, we were not able to visualize eNOS nor iNOS expression on osteoblasts, osteoclasts, trabecular bone and medullae in any of the groups.

Table 4 – eNOS and iNOS expression on tibiae of rats.

Group	eNOS	iNOS
SHAM	++ (external cortical methaphysis/ diaphysis)	++ (external cortical methaphysis/ diaphysis)
OVX	-	-
OVX-LIES	+ (distal cortical diaphysis)	+ (distal cortical diaphysis)
SHAM-L-NAME	-	-
OVX-L-NAME	-	-
OVX-LIES-L-NAME	-	-

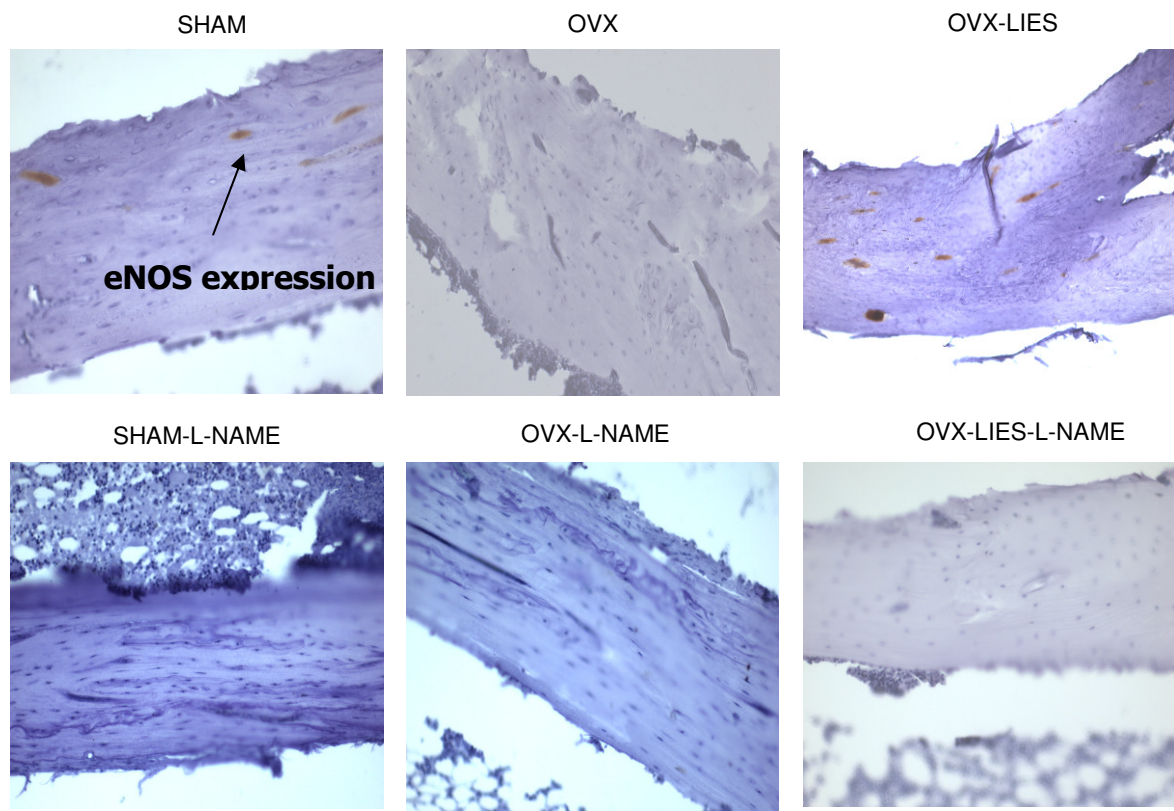


Figure 1 - eNOS expression by immunostaining on cortical bone of rat tibiae from the 6 groups. Similar expressions were observed for eNOS and iNOS. Magnification: SHAM and OVX = 100x and 200x for the other groups.

Apoptosis

After immunostaining for cleaved caspase-3 and the label of DNA fragmentation by TUNEL staining, strongly positive chondrocytes and osteocytes were present in cortical bone. In OVX rats, the percentage of apoptotic osteocytes was increased, and this difference was significant when compared to OVX+LIES group with caspase technique (fig 2) and compared to SHAM with TUNEL technique (table 5 and fig 3). L-NAME significantly increased the percentage of viable osteocytes and decreased osteocyte apoptosis in SHAM-L-NAME rats only with caspase-3 technique (*vs* SHAM). OVX-L-NAME showed a diminished percentage of apoptotic osteocytes when compared to OVX, but this difference was not observed between OVX-LIES-L-NAME and OVX-LIES. As the effects of L-NAME were the same as those of LIES, it was not possible to know if L-NAME could prevent the effects of LIES on osteocytes survival.

Table 5 - Caspase-3 and TUNEL results (MEAN±SD)

	SHAM	SHAM-L-NAME	OVX	OVX-L-NAME	OVX-LIES	OVX-LIES-L-NAME
<i>Caspase-3 technique</i>						
Viable osteocytes (%)*	82.4±9.4	94.4±2.4 ^a	13.3±9.5 ^{ab}	90.7±3.9 ^c	83.8±9	90.7±5.9
Apoptotic osteocytes (%)*	11.4±8.2	0.8±1.2 ^a	24.2±15.5 ^b	4.3±2.7 ^c	8.2±7.6	4.8±3.2
Empty lacunae (%)*	6.2±3.5	4.7±2.2	62.5±15.9 ^{ab}	5.1±1.9	8.0±5.6	4.5±4.0
Total number lacunae (/mm ²)	556.4±102	582.9±111.9	306.4±129 ^{ab}	605.5±149.8	493.5±123	492.4±108.2
<i>TUNEL technique</i>						
Viable osteocytes (%)*	84.7±11.5	91.6±2.2	46.3±14.7 ^{ab}	93.7±4.6 ^c	79.5±12.1	82.6±7.1
Apoptotic osteocytes (%)*	8.1±8.6	3.1±2.2	17.9±3.4 ^a	1.9±1.5 ^c	10.8±9.1	11.2±6.3
Empty lacunae (%)*	7.2±5.3	5.3±1.8	35.8±17.4 ^{ab}	4.3±6.0	9.7±7.2	6.2±4.2
Total number lacunae (/mm ²)	591.4±123	648.5±83.4	384.4±77 ^a	645.2±228.2	514.5±100	508.5±100.9

*expressed in percent of the total number of lacunae.

^ap<0.05 vs SHAM, ^bp<0.05 vs OVX+LIES and ^cp<0.05 vs OVX.

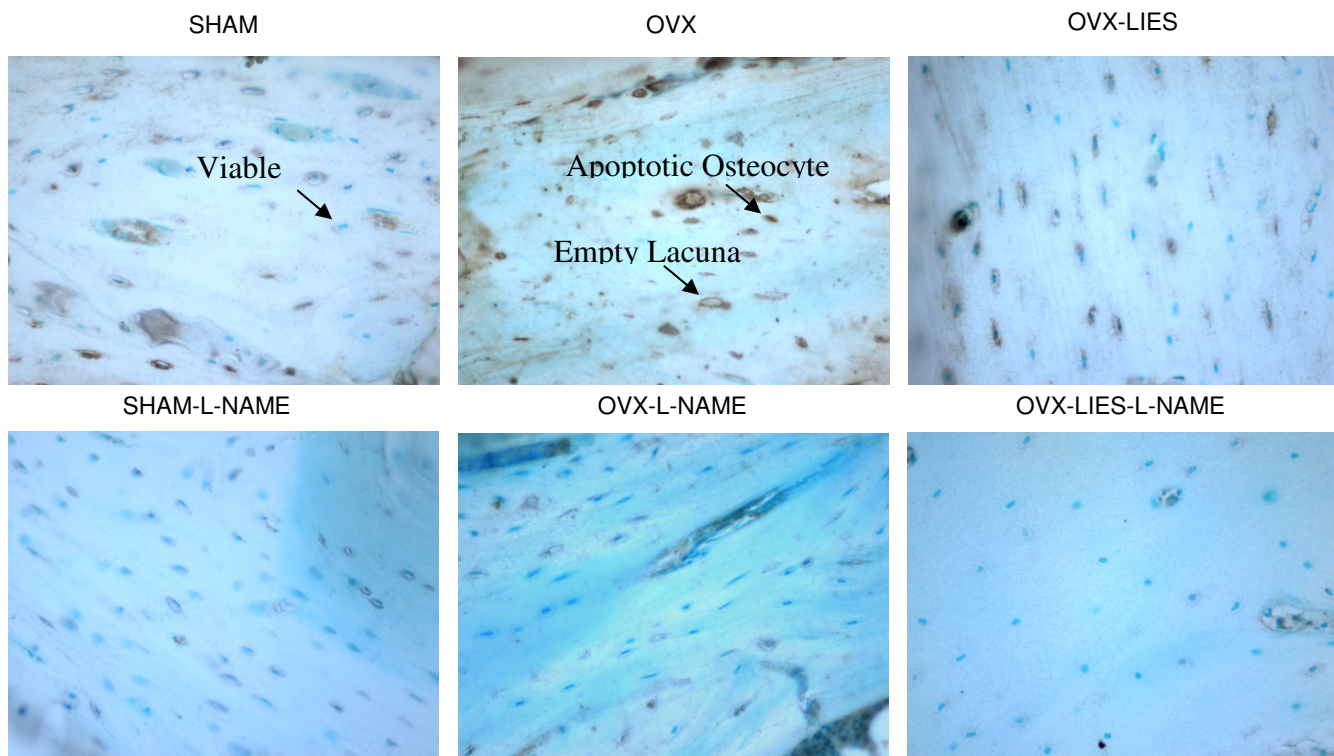


Figure 2 - Detection of osteocyte apoptosis by Caspase-3 technique (400X).

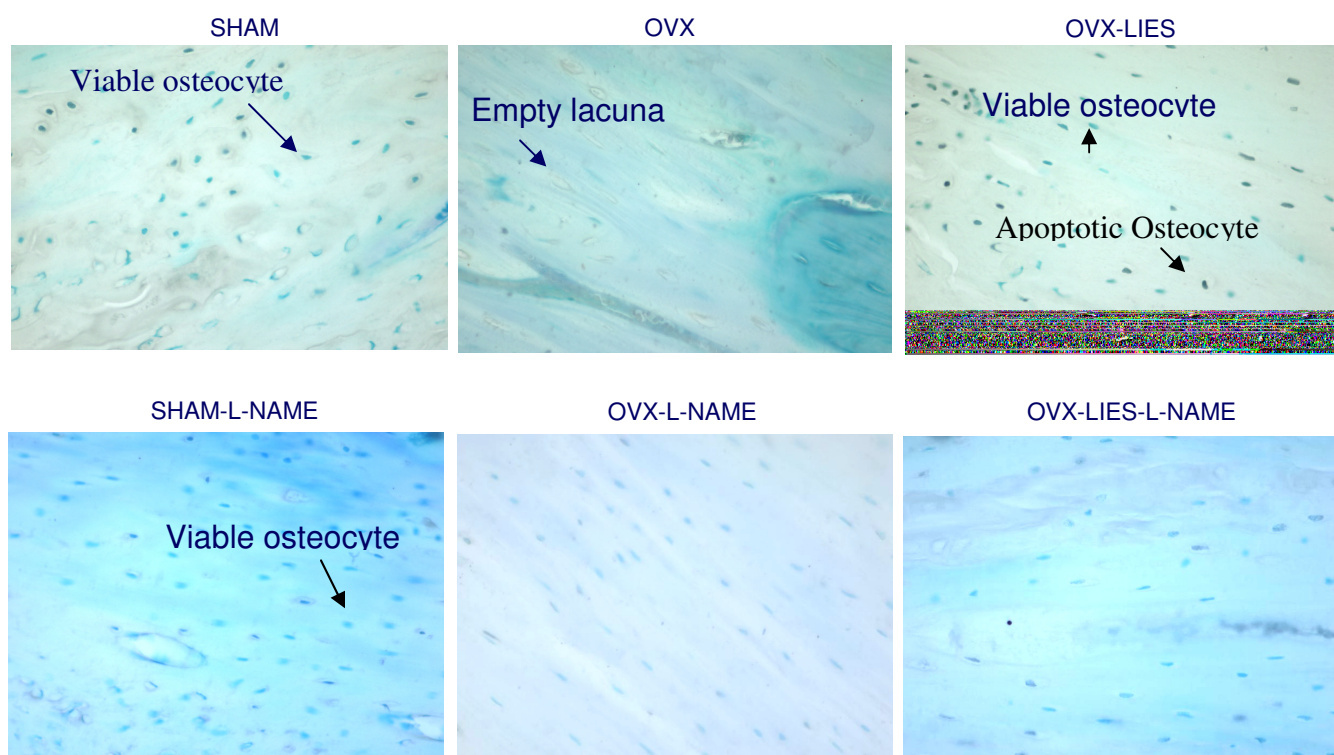


Figure 3 - Detection of osteocyte apoptosis by TUNEL technique (400x).

Discussion

Osteocytes are the most abundant bone cells and are believed to be the mechanosensors of bone, responding to mechanical stresses in interstitial fluid flow through their canaliculi. Under physical stimuli, chemical signals such as NO play a key role in the activity of osteoblasts/osteoclasts (Bakker et al., 2005; Hamed et al. 2006; Vatsa et al., 2006) and osteocytes (Zaman 1999; Klein-Nulend et al., 1995; Tan et al., 2006) that regulate bone remodeling.

Mechanically stimulated osteocytes release soluble factors that can inhibit osteoclastogenesis induced by other supporting cells including bone marrow stromal cells (You et al., 2008). Noble et al. (2003) have shown that mechanical loading has the capacity to regulate osteocytes apoptosis in rats, and shear stress can prevent osteocytes apoptosis, at least in part, via NO (Tan et al., 2006). Besides, NO was demonstrated to decrease RANKL protein and increase osteoprotegerin (OPG) protein expressions in murine stromal cells, which should lead to decreased recruitment of osteoclasts and positive bone formation (Fan et al., 2004).

Studies have shown that the density of osteocytes (Ma et al., 2008) and circulating NO products (Wimalawansa, 2007) significantly decrease with estrogen deficiency, as seen in postmenopausal women (Ma et al., 2008). In our previous study (Lirani-Galvao et al., 2008), we have confirmed that OVX, besides the bone loss and microarchitecture deterioration, may decrease osteocytes density, increase osteocyte apoptosis and abolish iNOS and eNOS expression in bone of rats. Moreover, we demonstrated that LIES could prevent both osteocyte apoptosis and absence of eNOS and iNOS expression on bone, induced by OVX. Thus mechanical loading, electrical stimulation and nitric oxide (NO) have positive influences on bone physiology.

NO production is induced by mechanical strain via upregulation of eNOS mRNA and protein, the predominant NOS in adult bone. Rahnert et al. (2008) found that mechanical strain may inhibit RANKL expression and this could be prevented by NOS inhibitors (L-NAME and L-NMMA) in stromal cells of mice. In another investigation, a pulsating fluid flow (PFF) upregulated Bcl-2 and downregulated caspase-3 expression in osteocytes *in vitro*; and L-NAME attenuated this effect. In osteocytes PFF did not affect p53 and c-Jun - transcription factors important to regulate the cell cycle - but L-NAME upregulated c-Jun expression. This suggests that PFF inhibits osteocyte apoptosis via alterations in Bcl-2 and caspase-3 gene expression, which is at least partially regulated by NO (Tan et al., 2008).

However, in the present study, *in vivo* and chronic treatment with L-NAME significantly increased the percentage of viable osteocytes and decreased osteocyte apoptosis in rats after 12 weeks of treatment (vs SHAM, with caspase-3 technique). As the effects of L-NAME on osteocytes, in all groups treated with it, were the same as those of LIES, it was not possible to know if L-NAME could prevent the effects of LIES on osteocyte survival. It is important to emphasize that this was the first time that L-NAME was used *in vivo* and for a long period of time (12 weeks) to study the hypothesis of NO being the mediator of electrical stimulation on bone. To confirm the biological effect of L-NAME, arterial blood pressure was measured in all rats (at the end of the 12 weeks protocol) before sacrifice and, as expected with the chronic use of this NOS inhibitor (Biancardi et al., 2007), those treated with L-NAME became hypertensive (data not shown).

Tsukahara et al. (1996) showed that oral administration of L-NAME (doses of 20 and 50 mg/dL of drinking water) for 4 weeks in rats caused hypertension but normal bone mineral content in the lumbar spine, and the highest dose (80 mg/dl) even caused a slight

decrease in bone mass. Pennisi et al., (2005) reported that a reduction of NO synthesis contributes to a deterioration of bone metabolism. L-NAME (50 mg/kg/day) was used for 4 weeks in Sprague-Dawley male rats and caused a significant decrease in total body, femur and spine BMDs and a significant increase in serum C-terminal telopeptides of type I collagen, which indicates bone resorption (Pennisi et al., 2005). However, as far as we known, there is no literature about the effects of 12 weeks of L-NAME treatment on bone of rats.

In the present investigation, besides the diminished osteocyte apoptosis, 12 weeks of L-NAME treatment (06 mg/kg/day) augmented TbN and NdN/TV and decreased BFR/BS, MS/BS and MAR, when compared to SHAM, demonstrated by histomorphometry, suggesting a biphasic effect of L-NAME on bone. One possible explanation is that the known hypertension provoked by chronic L-NAME treatment could have caused a mechanical stimulation on bone. Turner et al. (1997) demonstrated a positive correlation between bone formation and blood pressure (BP), suggesting that an augmentation of BP may lead to a mechanical stimulus of bone cells. Some authors (Okruhlicová et al., 2000) have already shown that long-lasting L-NAME treatment (40 mg/kg/day for 4 weeks) may even induce angiogenesis in rats. Aminoguanidine, a selective inhibitor of NO production via iNOS, stimulated neoangiogenesis and osteoclast-mediated bone remodeling *in vivo* in chick chorioallantoic membrane system and in cultures chick bone marrow OC-like cells model (Collin-Osdoby et al., 2000).

Female rats treated with L-NAME for 19 days (75 mg/kg/day) presented a reduction of 66% in mechanically induced BFR and MAR compared with the control group. BFR and MAR were not affected by L-NAME treatment in sham-loaded limbs. These results suggest that NO may play a role in the transduction of a mechanical stimulus into a biological response in bone. However, L-NAME alone caused significant reductions

in serum albumin and alkaline phosphatase and significant increases in serum blood urea nitrogen and creatinine (Turner et al., 1996).

In our study, LIES was not able to prevent the reduction of BV/TV and TbN caused by OVX in the presence of L-NAME (OVX-L-NAME vs OVX-LIES-L-NAME), as it did in the absence of this NO inhibitor. However, L-NAME did not block the effects of LIES on bone resorption (ES/BS and OCS/BS) of OVX rats. Consequently, it may be suggested that NO partially mediates the effects of LIES on bone, mediating the effects of LIES on bone structure but not on bone resorption.

Diniz et al. (2002) investigated if the effects of pulsed electromagnetic fields (PEMF) stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation were mediated by the increase in NO synthesis. They used osteoblasts MC3T3-E1 cell line cultures in the absence or in the presence of the NO synthase inhibitor L-NMMA. PEMF (for 15 days) increased significantly the nitrite concentration, DNA content and alkaline phosphatase activity, but these effects were partially blocked by L-NMMA. The authors concluded that PEMF stimulatory effects on the osteoblasts proliferation and differentiation were mediated by the increase of NO synthesis. Moreover, in osteoblast-like cells, the anabolic effects of PEMF may be partly mediated through the activation of eNOS, among other proteins (Schnoke and Midura, 2007) and PEMF may regulate osteoclastogenesis, bone resorption, OPG and RANKL concentrations in marrow culture system (Chang et al., 2005). These data support our results with electrical stimulation, which showed that NO may be a mediator of the positive effects of LIES on bone structure.

In the present investigation, as expected, L-NAME blocked iNOS and eNOS expressions in SHAM-L-NAME group. According to our previous data (Lirani-Galvao et al., 2008), LIES may prevent the blockage of eNOS and iNOS expressions caused by OVX (OVX-LIES vs OVX). However, in the presence of L-NAME (OVX-LIES-L-NAME

group), this prevention was not possible, suggesting that NO could be a mediator of the effects of LIES on bone of OVX rats.

Electric stimulation may also act through NO signaling on other cell types, such as human chondrocytes. L-NAME prevented the pulsing electric field (PEF)-stimulated increase in NO, cGMP, and DNA content in these cultured cells. The transduction pathway for PEF-stimulated chondrocyte proliferation involves NO, which results from a cascade that involves calcium, calmodulin, and cGMP production (Fitzsimmons et al., 2008).

In conclusion, our study showed that L-NAME partially blocks the effects of LIES on bone structure (but not on bone resorption) and on iNOS and eNOS expressions in OVX rats, suggesting that NO may be a mediator of the positive effects of LIES on bone. Nevertheless, it was not possible to identify if the known positive effects of LIES on osteocyte viability were mediated by NO, since the effects of L-NAME on these cells were similar to those caused by LIES. It is important to accentuate that this was the first time that L-NAME was used chronically for such a long period of time (12 weeks) to evaluate the role of NO on bone of rats; more specifically, to evaluate the hypothesis of NO being the mediator of electrical stimulation on bone. Apart from the NO pathway, we also suggest that more studies should be performed in order to investigate which other mechanisms could be involved in the transduction of electrical sign into bone tissue.

References

Bakker AD, Klein-Nulend J, Tanck E, Albers GH, Lips P, Burger EH. Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos Int* 2005; 16(8):983-9.

Basso N, Heersche JN. Effects of hind limb unloading and reloading on nitric oxide synthase expression and apoptosis of osteocytes and chondrocytes. *Bone* 2006; 39(4):807-14.

Biancardi VC, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Mar;40(3):401-8.

Burger EH, Klein-Nulend J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res.* 1999; 13:93-8.

Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res.* 2005 Nov;23(6):1308-14.

Chavassieux P, Arlot M, Meunier P. Clinical use of bone biopsy. In: *Osteoporosis Second Edition Volume 2*, Marcus R., Feldman D., Kelsey J. eds., Academic Press, San Diego, USA, 2001; 501-509.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Osdoby P. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. *J Bone Miner Res.* 2000 Mar;15(3):474-88.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, Vegeto E, Caputi AP, Van De Loo FA, Puzzolo D, Maggi A. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* 2003; 144(3):1098-107.

Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 2002; 7:18-23.

Faleiro, L., R. Kobayashi, H. Fearnhead, and Y. Lazebnik. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO* 1997; 16:2271-2281.

Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, Rosen C, Nanes MS, Rubin J. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004; 145(2):751-9.

Fitzsimmons RJ, Gordon SL, Kronberg J, Ganey T, Pilla AA. A pulsing electric field (PEF) increases human chondrocyte proliferation through a transduction pathway involving nitric oxide signaling. *J Orthop Res.* 2008 Jun;26(6):854-9.

Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 2007; 40(4):1172-7.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3):493-501.

Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Mongiorgi R, Gnudi S, Zati A. Experimental surgical model in osteoporosis study. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1993; 69(7-8):453-60.

Guo X, Lu X, Ren H, Levin ER, Kassab GS. Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 May;290(5):H1788-97.

Hamed A, Kim P, Cho M. Synthesis of nitric oxide in human osteoblasts in response to physiologic stimulation of electrotherapy. *Ann Biomed Eng.* 2006; 34(12):1908-16.

Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, Girgis SI, Kontinen YT, Goodship AE, MacIntyre I, Polak JM. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone* 2003; 32:142-149.

Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 217(2):640-8.

Lind M, Bunger C. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J.* 2001; 10 Suppl 2:S102-9.

Lirani-Galvao APR, Bergamaschi CT, Silva OL, Lazaretti-Castro M. Electrical Field Stimulation Improves Bone Mineral Density in Ovariectomized Rats. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(11):1501-5.

Lirani-Galvao APR, Chavassieux P, Portero-Muzy N, Bergamaschi CT, Silva OL, Carvalho AB, Lazaretti-Castro M, Delmas PD. Low Intensity Electrical Stimulation Counteracts the Effects of Ovariectomy on Bone Tissue of Rats: Effects on Bone Microarchitecture, Viability of Osteocytes and Nitric Oxide Expression. *Calcified Tissue Int*, submitted in august 2008.

Ma YL, Dai RC, Sheng ZF, Jin Y, Zhang YH, Fang LN, Fan HJ, Liao EY Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *J Biomech.* 2008;41(6):1324-32.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):109-42.

Mullender MG, Dijcks SJ, Bacabac RG, Semeins CM, Van Loon JJ, Klein-Nulend J. Release of nitric oxide, but not prostaglandin E2, by bone cells depends on fluid flow frequency. *J Orthop Res* 2006; 24(6):1170-7.

Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284(4):C934-43.

Okruhlicova L, Tribulova N, Bernatova I, Pechanova O. Induction of angiogenesis in NO-deficient rat heart. *Physiol Res.* 2000;49(1):71-6

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units.

Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2(6):595-610.

Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest.* 1983; 72(4):1396-409.

Pennisi P, D'Alcamo MA, Leonetti C, Clementi A, Cutuli VM, Riccobene S, Parisi N, Fiore CE. Supplementation of L-arginine prevents glucocorticoid-induced reduction of bone growth and bone turnover abnormalities in a growing rat model. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(2):134-9.

Prisby RD, Ramsey MW, Behnke BJ, Dominguez JM 2nd, Donato AJ, Allen MR, Delp MD. Aging reduces skeletal blood flow, endothelium-dependent vasodilation, and NO bioavailability in rats. *J Bone Miner Res.* 2007 Aug;22(8):1280-8.

Rahnert J, Fan X, Case N, Murphy TC, Grassi F, Sen B, Rubin J. The role of nitric oxide in the mechanical repression of RANKL in bone stromal cells. *Bone.* 2008 Jul;43(1):48-54.
Schnoke M, Midura RJ. Pulsed electromagnetic fields rapidly modulate intracellular signaling events in osteoblastic cells: comparison to parathyroid hormone and insulin. *J Orthop Res.* 2007 Jul; 25(7):933-40.

Soukhova-O'Hare G, Lei Z, Falcone JC, Barati MT, Feitelson JB, Rao ChV, Fleming JT. Bone medullary arterioles from ovariectomized rats have smaller baseline diameters but normal eNOS expression and NO-mediated dilation. *Life Sci.* 2005 Aug 26;77(15):1799-812.

Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, Everts V, Klein-Nulend J. Fluid shear stress inhibits TNFalpha-induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res.* 2006; 85(10):905.

Tan SD, Bakker AD, Semeins CM, Kuijpers-Jagtman AM, Klein-Nulend J. Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 16;369(4):1150-4.

Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I, Sudo M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol.* 1996 May;270(5 Pt 1):E840-5.

Turner CH, Takano Y, Owan I, Murrell GA. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol.* 1996 Apr;270(4 Pt 1):E634-9.

Turner CH, Owan I, Jacob DS, McClintock R, Peacock M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone.* 1997 Dec;21(6):487-90.

Vatsa A, Mizuno D, Smit TH, Schmidt CF, MacKintosh FC, Klein-Nulend J. Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res.* 2006 Nov;21(11):1722-8

Wimalawansa SJ, De Marco G, Gangula P, Yallampalli C. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone* 1996; 18(4):301-4.

Wimalawansa SJ, Chapa MT, Yallampalli C, Zhang R, Simmons DJ. Prevention of corticosteroid-induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. *Bone.* 1997 Sep;21(3):275-80.

Wimalawansa SJ. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1117:283-97.

You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, Kingery W, Malone AM, Kwon RY, Jacobs CR. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone.* 2008 Jan;42(1):172-9.

Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1123-31.

Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem*. 2006 Jun 9;281(23):15809-20.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O artigo 1 demonstrou que a EE melhorou a DMO e o conteúdo mineral ósseo (CMO) de ratas ovariectomizadas, mantendo-os com níveis semelhantes aos atingidos pelo grupo SHAM. Enquanto que as medidas de DMO dos grupos SHAM e OVX-EE aumentaram significativamente ao longo do estudo, o grupo OVX não apresentou diferença em relação ao seu basal e tornou-se significativamente inferior aos outros 2 grupos. Não foi possível demonstrar, no entanto, uma redução da massa óssea medida pela densitometria no grupo ovariectomizado. Acreditamos que isto se deveu ao fato de termos utilizado ratas jovens (12 semanas de idade) somado ao curto período do estudo. Entretanto, tivemos o cuidado de avaliar, no momento do sacrifício, a efetividade da ovariectomia através do exame do útero atrófico em todas as ratas que haviam sido submetidas a este procedimento. Assim, a estimulação elétrica por 11 semanas propiciou que as ratas ovariectomizadas mantivessem um ganho de massa óssea equivalente ao ganho do grupo SHAM.

A densitometria óssea é reconhecidamente um método útil para avaliação de massa óssea em ratos, tendo sido largamente utilizada na literatura científica (Nagy et al., 2001). No entanto, esta técnica não possui a capacidade de avaliar a qualidade e a estrutura óssea, aspectos muito melhor detalhados na análise histomorfométrica (Libouban et al., 2002). Assim, as amostras de tíbia das ratas ovariectomizadas do presente trabalho, submetidas à técnica de histomorfometria óssea, demonstraram microarquitetura óssea deteriorada e volume ósseo diminuído (BV/TV), sugerindo que a densitometria óssea não tenha tido uma boa acurácia para detectar estas mudanças neste modelo experimental.

Um estudo sobre os efeitos do PEMF no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, revelou que seis semanas de tratamento aumentaram a

espessura cortical das tíbias e os níveis de fosfatase alcalina plasmática das ratas, indicando maior formação óssea (Sert et al., 2002). Em uma investigação com indivíduos portadores de osteoporose devido a lesão medular, o PEMF foi utilizado nos joelhos destes sujeitos e, em 3 meses de tratamento, houve um aumento significativo de 5.1% na DMO de joelho enquanto que os indivíduos não tratados tiveram uma queda de 6.6% neste mesmo parâmetro (Garland et al., 1999).

A unidade eletrônica e os parâmetros de dosagem da EE foram os mesmos do ultra-som pulsado de baixa intensidade, que já foi aprovado pela FDA americana para acelerar o reparo ósseo no caso de fraturas (Lind e Bunger, 2001). Carvalho e Cliquet-Junior (2004) utilizaram o ultra-som pulsado de baixa intensidade no fêmur de ratas ovariectomizadas por 4 semanas e observaram um aumento significativo do CMO do fêmur proximal, o que está de acordo com nossos resultados com a EE após 11 semanas de tratamento. No entanto, em uma investigação clínica, o ultra-som pulsado de baixa intensidade foi utilizado por 6 semanas no calcâneo de pacientes com lesão medular recente (1 a 6 meses) mas não foram encontradas quaisquer alterações nos resultados da densitometria óssea (Warden et al., 2001). É importante ressaltar que o ultra-som é um excelente método para o tratamento de fraturas, por estas serem localizadas e de fácil acesso para o cabeçote do ultra-som. No entanto, quando se trata de uma doença sistêmica como a osteoporose, a EE citada no presente trabalho parece ser um método mais apropriado por expor o corpo todo do animal à estimulação.

No artigo 2, investigamos se a EE teria algum efeito sobre a viabilidade de osteócitos, a expressão de NOS e sobre parâmetros histomorfométricos. A

escolha destes parâmetros foi feita após uma detalhada revisão bibliográfica, que nos mostrou que os mesmos têm sido apontados como possíveis mediadores intra e intercelulares na transdução dos efeitos de estímulos físicos, especialmente a estimulação mecânica, sobre o tecido ósseo.

No estudo de Basso e Heersche (2006), o modelo de suspensão pela cauda em ratos (por 2 semanas) causou um aumento na apoptose de osteócitos, número de osteoclastos e diminuição na massa óssea, que regressaram aos valores basais com o retorno da carga, juntamente com aumento da expressão de eNOS e iNOS. Em nosso trabalho, as ratas OVX, 12 semanas após a cirurgia, demonstraram microarquitetura óssea deteriorada, aumento da porcentagem de osteócitos apoptóticos e ausência da expressão de eNOS e iNOS no osso cortical de tíbias, evidenciando, mais uma vez, que estes fatores estão provavelmente interligados quando se trata de perda óssea.

A perda óssea e a deterioração da microarquitetura, com aumento do *turnover* e da reabsorção óssea causados pela ovariectomia nas ratas do grupo OVX, já são bem conhecidos e freqüentemente citados na literatura (Fuchs et al., 2008; Chang e Chang, 2003). Além disso, em nosso estudo, houve um aumento de 109% de osteócitos apoptóticos, nas tíbias das ratas OVX, 12 semanas após a ovariectomia. Outros autores (Tomkinson et al., 1998) observaram um aumento de 400% na porcentagem de osteócitos apoptóticos em tíbia de ratas 3 semanas após a cirurgia, mas não foram encontrados na literatura dados referentes a 12 semanas após a ovariectomia.

Armour e Ralston, em 1998, demonstraram que o estrógeno aumenta a expressão de eNOS em cultura de células semelhantes a osteoblastos. Nossos resultados, por outro lado, complementam tais achados, pois demonstraram que a

deficiência de estrógeno causada pela ovariectomia induziu a ausência de expressão de NOS no tecido ósseo de ratas. Estudos anteriores já haviam evidenciado que os efeitos da ovariectomia dependem da redução na expressão da NOS (Grassi et al., 2006; Wimalansa et al., 1996; Samuels et al., 2001). Grassi e cols (2006) demonstraram, em cultura de células de medula óssea de camundongos, que a ovariectomia causa um declínio na expressão da eNOS após a cirurgia, corroborando com nossos resultados. Entretanto, estes autores verificaram ainda que após 10 semanas da ovariectomia estes valores voltaram ao normal. Por outro lado, contradizendo o acima exposto, Cuzzocrea e cols (2003) afirmam que a iNOS poderia mediar a perda óssea induzida por ovariectomia em camundongos. Animais *knockout* para iNOS e *wild-type* tratados com inibidor específico da iNOS não apresentaram perda óssea 5 semanas após ovariectomia, o que levou os autores a sugerir que a iNOS seria um mediador dos efeitos negativos da depleção estrogênica no tecido ósseo.

Demonstramos, ainda no artigo 2, que a EE preservou a viabilidade de osteócitos, a expressão de eNOS e iNOS, a estrutura e a microarquitetura óssea em ratas ovariectomizadas. Além disso, a EE preservou o *turnover* ósseo e a reabsorção óssea em níveis similares àqueles do grupo SHAM, sem, no entanto, preservar a conectividade óssea. Estes dados são inéditos na literatura internacional e a maioria dos dados relativamente comparáveis aos nossos foram obtidos com estimulação mecânica.

Nossos resultados corroboram com os de Chang e Chang (2003) que utilizaram um PEMF para prevenir a perda óssea em ratas ovariectomizadas e obtiveram um aumento significativo do volume ósseo e número de trabéculas e diminuição do espaçamento trabecular na metáfise proximal da tíbia. Em outro

estudo, ratas ovariectomizadas há oito semanas receberam um implante de titânio na metáfise proximal da tíbia, e a região foi tratada com PEMF ou vibração mecânica. Após 2 semanas de tratamento, foi constatado que o volume ósseo e o número de trabéculas ao redor do implante eram significativamente maiores nos grupos tratados com PEMF e vibração quando comparados ao controle (Akca et al., 2007).

Rubin e cols (2002) demonstraram, através de micro-tomografia computadorizada, que a vibração mecânica por um ano é capaz de aumentar o CMO em 10.6%, o número de trabéculas em 8.3% e diminuir o espaçamento trabecular em 11.3% em fêmures de ovelhas fêmeas adultas intactas, quando comparadas às controles. Estes resultados, entretanto, não foram confirmados em ratas intactas submetidas à vibração, mas um efeito positivo foi observado em ratas ovariectomizadas. A vibração em ratas ovariectomizadas causou um aumento significativo da área cortical e do perímetro periosteal e endosteal (Rubinacci et al., 2008). Como se acredita que o estímulo mecânico sobre o osso é transformado em elétrico e assim transmitido para o interior das células, modificando seu metabolismo, é bastante sugestivo que a estimulação elétrica possa ser utilizada diretamente sobre este tecido induzindo modificações metabólicas semelhantes. Assim, apesar de não haver na literatura estudos sobre os efeitos da EE sobre a microarquitetura óssea, nossos resultados encontram fundamentação e estão de acordo com os dados de diversos autores que utilizaram outros agentes físicos, como o PEMF e a vibração mecânica, para melhorar estes parâmetros histomorfométricos na perda óssea por ovariectomia.

Além de prevenir a perda óssea causada pela ovariectomia e tratar fraturas, agentes físicos como o PEMF e a EE podem ser utilizados, respectivamente, para

prevenir a osteonecrose (Ishida et al., 2008) e tratar a osteoartrite (Brighton et al., 2008) em modelos experimentais. Em um estudo com fêmures de coelhos, foi demonstrado que o tratamento com PEMF por 4 semanas após injeção de metilprednisolona (20 mg/kg), diminui a incidência de osteonecrose causada pelo corticosteróide em relação ao grupo controle (37.5% vs 65%) (Ishida et al., 2008). A EE também demonstrou efeitos positivos em tecido osteoartrítico de joelho de humanos em cultura, causando um aumento significativo na produção de colágeno e proteoglicanas, e na expressão de RNA mensageiro de colágeno tipo II e agrecanas, o que culminou com uma preservação da matriz cartilaginosa (Brighton et al., 2008).

Huang e cols (2008-a) sugeriram recentemente que os osteócitos são as células sensoriais que captam os sinais da EE e os “traduzem” na forma de sinais bioquímicos; estes sinais seriam então transferidos através dos processos dendríticos dos osteócitos para as células efectoras, como osteoblastos e osteoclastos que iniciariam a formação óssea. No presente estudo, a EE preservou a viabilidade de osteócitos após 12 semanas de tratamento em ratas ovariectomizadas. Estes resultados são comparáveis a diversos trabalhos que já citaram os efeitos positivos da estimulação mecânica sobre a viabilidade de osteócitos. Em um trabalho experimental com ratos cujas ulnas foram submetidas a períodos de cargas mecânicas compressivas, houve uma redução relativa de 40% na apoptose de osteócitos em apenas 3 dias de tratamento. No entanto, quando a intensidade da carga mecânica foi duplicada, houve dano no tecido ósseo bem como um aumento de 800% no número de osteócitos apoptóticos (Noble et al., 2003). É importante ressaltar que a carga mecânica é necessária para a fisiologia óssea, porém, quando em excesso, leva à fadiga do tecido,

podendo dar origem a micro-lesões que causam a morte celular de osteócitos (Verborgt et al., 2000).

Em amostras de osso trabecular humano mantidas em cultura, foi observado que a estimulação mecânica previne a apoptose de osteócitos e aumenta os níveis de fosfatase alcalina na superfície óssea (Mann et al., 2006). Além disso, o tratamento medicamentoso com bifosfonatos (Plotkin et al., 1999), hormônio paratireoidiano (Jilka et al., 1999) e hormônios sexuais (Kousteni et al., 2001) previne a apoptose de osteócitos, levantando a hipótese de que a preservação da integridade da rede de osteócitos contribui para a eficácia anti-fratura destes agentes.

O mecanismo de transdução do sinal mecânico para inibir a apoptose de osteócitos continua pouco conhecido, mas sugere-se que o NO tenha um importante papel neste processo (Tan et al., 2006). A estimulação mecânica aumenta a liberação de NO por osteócitos (Klein-Nulend et al., 1995a) e por células semelhantes a osteoblastos em cultura (Mullender et al., 2006). Bakker e cols (2005), em um trabalho com células ósseas de mulheres osteoporóticas, observaram que o estrógeno e a estimulação mecânica aumentam a síntese de NO e prostaglandina E_2 , e que estes têm efeito aditivo na produção destas moléculas quando utilizados concomitantemente.

Além disso, diversos estudos com cultura de células semelhantes à osteócitos, osteoblastos e progenitores de osteoblastos identificaram outros prováveis participantes dos mecanismos de mecanotransdução no osso (Duncan e Turner, 1995). Rawlinson e cols (1996) sugerem a existência de canais iônicos regulados mecanicamente. As integrinas, que são moléculas responsáveis pela adesão das células à matriz extracelular, também estão envolvidas na

transmissão do estímulo mecânico no tecido ósseo (Pavalko et al., 1998; Leucht et al., 2007), assim como a produção de prostaglandina E_2 pelos osteoblastos via ativação de proteínas G em resposta aos estímulos mecânicos (Reich et al., 1997). De acordo com Robinson e cols (2006), a via de sinalização Wnt/beta-catenina também parece estar envolvida na resposta óssea fisiológica normal ao estímulo mecânico. Estes autores demonstraram neste estudo, *in vivo* e *in vitro*, que a ativação desta via aumenta a sensibilidade de osteoblastos/osteócitos à carga mecânica. No entanto, apesar de inúmeras moléculas e vias de sinalização terem sido associadas à transdução de sinais mecânicos, sugere-se um papel de destaque às prostaglandinas e ao NO, pois estes são rapidamente liberados pelas células estimuladas mecanicamente e possibilitam uma comunicação intercelular na rede tridimensional de células ósseas (Liedert et al, 2006).

Na presente investigação, também demonstramos que a EE é capaz de manter a expressão de eNOS e iNOS no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. Assim, constatamos que as alterações da microarquitetura óssea e da viabilidade de osteócitos induzidas por deficiência estrogênica e pelo tratamento com EE estão associadas a modificações na expressão de eNOS e iNOS, não excluindo o fato de que outros mecanismos possam estar envolvidos.

Assim, com base nos resultados do artigo 2, demonstramos que a EE foi capaz de preservar a estrutura do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas e que este fenômeno acompanhou-se da preservação da viabilidade dos osteócitos, que possivelmente mantiveram a expressão de eNOS e iNOS. Nossa hipótese do provável mecanismo de ação da estimulação elétrica no tecido ósseo é de que os osteócitos seriam as células capazes de captar o sinal elétrico e traduzí-lo em mediadores intracelulares, como o NO produzido através da ativação das enzimas

eNOS e iNOS. O aumento na produção de NO associa-se a um aumento de formação óssea pelos osteoblastos (Diniz et al., 2002; Vezeredis et al., 2006) e a uma diminuição da reabsorção óssea pelos osteoclastos (Fan et al., 2004; Wang et al., 2004), que a longo prazo, manteriam a qualidade óssea. Para testar esta hipótese, utilizamos um potente bloqueador das NOS (L-NAME), a fim de avaliar se os efeitos da EE estariam sendo mediados pelo NO, o que resultou no artigo 3.

Sendo o NO um potente vasodilatador, o aumento dos níveis da pressão arterial (PA) causado pelo uso do L-NAME é bem conhecido e esperado (Biancardi et al., 2007). Assim, neste trabalho, utilizamos uma baixa dose de L-NAME (Da Cunha et al., 2004) para evitar uma hipertensão grave a ponto de inviabilizar o protocolo de 12 semanas. Por este motivo, as alterações cardiovasculares foram monitoradas antes do sacrifício dos animais. Como era de se esperar, as médias da PA dos animais dos grupos SHAM-L-NAME (156.5 ± 16 mmHg), OVX-L-NAME (188.4 ± 2.6 mmHg) e OVX-EE-L-NAME (145 ± 20 mmHg) foram respectivamente maiores do que as dos grupos SHAM (107.8 ± 13 mmHg), OVX (116.9 ± 7.6 mmHg) e OVX-EE (114.4 ± 9.6 mmHg). Por outro lado, não observamos alterações hemodinâmicas com o uso prolongado de EE, o que confirma a segurança deste procedimento. Ao final do experimento foram avaliados PA, frequência e débito cardíaco, que não se mostraram diferentes entre os grupos OVX -EE e OVX não tratados com L-NAME (anexo 12).

O efeito bloqueador do L-NAME sobre a NO sintase no tecido ósseo também foi obtido, uma vez que o grupo SHAM-L-NAME, tratado com esta droga, não expressou eNOS ou iNOS na tíbia. No entanto, o uso do L-NAME por 12 semanas causou efeitos inesperados no tecido ósseo, como a diminuição da apoptose de osteócitos e aumento da conectividade óssea (grupo SHAM-L-NAME

vs SHAM). Um efeito semelhante foi observado por Turner e cols (1997), que sugeriram que o estímulo mecânico causado pela hipertensão arterial e pela neoangiogênese (Okruhlicová et al., 2000) tenham estimulado os osteócitos, sensíveis a pressões de fluidos extracelulares (Klein-Nulend et al., 1995b). Desta forma, não foi possível detectar se o L-NAME seria capaz de bloquear os efeitos do EE nos osteócitos, pois ambos aumentaram a viabilidade destas células. Além do mais, não foram encontrados na literatura trabalhos a respeito da viabilidade de osteócitos em animais *in vivo* tratados com L-NAME.

Por outro lado, sabe-se que a via do NO está presente em uma série de sistemas e tecidos e seu bloqueio poderia desencadear alterações não medidas em nosso estudo. Shankar e cols (2000) demonstraram que camundongos *knockout* para eNOS e nNOS apresentam resistência à insulina e que o NO parece ter um importante papel na modulação da sensibilidade a insulina e metabolismo de carboidratos. Em outra investigação, foi demonstrado que camundongos *knockout* para eNOS (eNOS^{-/-}) apresentavam várias anormalidades ósseas, como uma acentuada redução do volume e formação óssea em animais adultos jovens (6 a 9 semanas) através de histomorfometria óssea, mas que a partir da 12^a semana de vida, estes valores se assemelhavam aos normais (camundongos *wild-type*). A redução na formação óssea não foi relacionada a um aumento do número ou atividade de osteoclastos, mas sim a osteoblastos não-funcionais. O número de osteoblastos e a atividade de mineralização eram reduzidos nos animais eNOS^{-/-}, e os osteoblastos da calvária *in vitro* apresentavam proliferação e diferenciação diminuídas (avaliadas respectivamente através da atividade da fosfatase alcalina e deposição mineral) (Aguirre et al., 2001).

O uso do L-NAME, em altas doses, por 4 semanas em ratos machos não causou alterações na DMO no estudo de Tsukahara e cols (1996) (até 80 mg/kg/dia), enquanto que Pennisi e cols (2005) reportaram um decréscimo significativo de DMO total, de fêmur e de coluna, com a dose de 50 mg/kg/dia de L-NAME. Estes dados não estão de acordo com nossos resultados, que demonstraram um aumento de 16,6% na DMO total das ratas SHAM-L-NAME que foram tratadas com este inibidor da NOS (06 mg/kg/dia) por 12 semanas - quase o dobro de ganho de massa óssea quando comparado ao grupo SHAM (8,5%) (anexo 7).

Na análise histomorfométrica, além do maior número de trabéculas e da maior conectividade, as ratas SHAM-L-NAME apresentaram uma diminuição na velocidade de formação e mineralização óssea (BFR/BS, MS/BS e MAR, vs SHAM), sugerindo um efeito bifásico do L-NAME. Nossa interpretação para estes achados foi a de que esta diminuição na formação e mineralização haviam sido precedidas por um aumento na formação, que resultou em maior número de trabéculas e de conectividade. Porém, é importante lembrar que esta é a primeira investigação com ratos *in vivo* que utiliza o L-NAME por um período prolongado (12 semanas) para estudar o tecido ósseo, o que limita a discussão de nossos resultados, mas que, por outro lado, abre uma nova linha de investigação futura.

Em um trabalho com osteoblastos em cultura, Diniz e cols (2002) concluíram que os efeitos estimulatórios do PEMF na proliferação e diferenciação de osteoblastos são mediados pelo aumento da síntese de NO. Os osteoblastos (linhagem de células MC3T3-E1) foram utilizados com ou sem um inibidor de NOS (L-NMMA - N^G-monomethyl-L-arginine) e então submetidos à estimulação PEMF por 15 dias. O PEMF aumentou significativamente a síntese de NO, a

proliferação celular e a diferenciação de osteoblastos, determinados por maiores concentrações de nitrato no meio condicionado, conteúdo de DNA e atividade da fosfatase alcalina, respectivamente. Estes efeitos estão associados ao aumento da síntese de NO, já que a adição de L-NMMA inibiu estes efeitos estimulatórios do PEMF nas células.

Turner e cols (1996), em uma investigação experimental, demonstraram uma redução de 66% nas taxas de formação e mineralização óssea (BFR/BS e MAR) dos fêmures das ratas tratadas com estímulo mecânico e L-NAME, quando comparadas às ratas apenas estimuladas mecanicamente. Do mesmo modo, em nosso trabalho, foi demonstrado pela primeira vez *in vivo* que o NO pode ser um mediador dos efeitos da EE no tecido ósseo. No presente estudo, o L-NAME foi capaz de bloquear os efeitos da EE na expressão de eNOS e iNOS e na estrutura óssea em ratas ovariectomizadas. Os animais OVX tratados com EE não expressaram eNOS e iNOS no tecido ósseo quando os mesmos estavam sendo tratados com L-NAME (grupo OVX-EE-L-NAME). A EE não foi capaz de prevenir a redução de BV/TV e TbN causada pela ovariectomia na presença de L-NAME (OVX-L-NAME vs OVX-EE-L-NAME), como ocorreu na ausência deste inibidor de NO. Porém, o L-NAME não bloqueou os efeitos da EE na reabsorção óssea (ES/BS e OCS/BS) de ratas OVX. Assim, sugerimos que o NO possa ser um mediador dos efeitos da EE na expressão de eNOS e iNOS e na estrutura óssea, mas não na reabsorção.

Com base neste trabalho, sugere-se que a estimulação elétrica de baixa intensidade seja um método eficiente na prevenção dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre o tecido ósseo. Embora seja vasta a literatura que confirma a importância dos estímulos mecânicos e elétricos sobre o tecido ósseo, poucos

são os trabalhos que se aprofundaram na investigação das possíveis vias metabólicas que intermedeiam estes efeitos. Desta forma, são fundamentais novas pesquisas científicas destinadas à melhor descrever os seus mecanismos de ação.

Além disso, baseado em nossos achados e fundamentado em outros estudos já existentes na literatura, o uso da estimulação elétrica de baixa intensidade para a prevenção da osteopenia e osteoporose em mulheres pós-menopausadas parece bastante promissora e interessante. Além de ser aparentemente inócua em relação a efeitos adversos, poderia se tornar uma alternativa prática e economicamente viável para substituir os tratamentos farmacológicos que trazem consigo efeitos colaterais, acabando por restringir seu uso em uma parcela dos pacientes osteoporóticos.

Entretanto, sabemos que a transferência para a espécie humana de conhecimentos obtidos em estudos experimentais deve ser feita com bastante cautela. Para que a indicação de uma terapia não medicamentosa como esta seja validada em seres humanos, estudos randomizados prospectivos e de longa duração devem ser implementados de maneira controlada. Caso contrário, alternativas terapêuticas potencialmente valiosas como esta podem acabar caindo em descrédito e nunca passarem a ser realmente utilizadas na prática clínica.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitiram concluir que:

1. A estimulação elétrica de baixa intensidade proposta nesta intervenção foi capaz de neutralizar os efeitos da ovariectomia sobre a densidade mineral óssea de ratas após 11 semanas de tratamento.
2. A estimulação elétrica de baixa intensidade preservou a estrutura e a microarquitetura óssea em ratas ovariectomizadas, sem, no entanto, melhorar a conectividade trabecular.
3. A estimulação elétrica de baixa intensidade preservou a viabilidade de osteócitos e preveniu a apoptose dos mesmos no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas;
4. A estimulação elétrica de baixa intensidade preservou a expressão das enzimas óxido nítrico sintase endotelial e indutível no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas;
5. O L-NAME foi capaz de bloquear os efeitos da estimulação elétrica de baixa intensidade na expressão da enzima óxido nítrico sintase e na estrutura óssea de ratas ovariectomizadas;
6. O óxido nítrico é um provável mediador dos efeitos da estimulação elétrica de baixa intensidade no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994 Jul;55(3):287-99.

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res.* 2006 Apr;21(4):605-15.

Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez de Marticorena I, Hukkanen M, Huang P, MacIntyre I, Polak J. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am J Pathol.* 2001 Jan;158(1):247-57.

Akai M, Kawashima N, Kimura T, Hayashi K. Electrical stimulation as an adjunct to spinal fusion: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Bioelectromagnetics.* 2002 Oct;23(7):496-504.

Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang TL, Cehreli M. Micro-morphologic changes around biophysically-stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med.* 2007 Jul 16;3:28.

Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1998; 139(2):799-802.

Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;320: 1163-68.

Bakker AD, Klein-Nulend J, Tanck E, Albers GH, Lips P, Burger EH. Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos Int* 2005; 16(8):983-9.

Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science*. 1974 May 3;184(136):575-7.

Bassett CA, Pilla AA, Pawluk RJ. A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*. 1977 May;(124):128-43.

Basso N, Heersche JN. Effects of hind limb unloading and reloading on nitric oxide synthase expression and apoptosis of osteocytes and chondrocytes. *Bone* 2006; 39(4):807-14.

Biancardi VC, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Mar;40(3):401-8.

Biswas PN, Wilton LV, Shakir SA. Pharmacovigilance study of alendronate in England. *Osteoporos Int* 2003; 14: 507-514.

Borsalino G, Bagnacani M, Bettati E, Fornaciari F, Rocchi R, Uluhogian S, Ceccherelli G, Cadossi R, Traina GC. Electrical stimulation of human femoral intertrochanteric osteotomies. Double-blind study. *Clin Orthop* 1988: 256–263.

Brighton CT, Pollack SR. Method for preventing and treating osteoporosis in a living body by using electrical stimulation non-invasively. United States Patent. Patent number 4,467,808. August 28, 1984. Acesso a <http://www.freepatentsonline.com/4467808.html> em 02/07/08.

Brighton CT, Wang W, Clark CC. The effect of electrical fields on gene and protein expression in human osteoarthritic cartilage explants. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Apr;90(4):833-48.

Brighton CT, Wang W, Seldes R, Zhang G, Pollack SR. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A: 1514-1523.

Burger EH, Klein-Nulend J. Responses of bone cells to biomechanical forces *in vitro*. *Adv Dent Res*. 1999; 13:93-8.

Caballero-Alías AM, Loveridge N, Lyon A, Das-Gupta V, Pitsillides A, Reeve J. NOS isoforms in adult human osteocytes: multiple pathways of NO regulation?. *Calcified Tissue International* 2004; 75:78-84.

Camargo MB, Cendoroglo MS, Ramos LR, de Oliveira Latorre Mdo R, Saraiva GL, Lage A, Carvalhaes Neto N, Araújo LM, Vieira JG, Lazaretti-Castro M. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of São Paulo, Brazil. *Osteoporos Int* 2005; 16: 1451-1460.

Carvalho DC, Cliquet Júnior A. The action of low-intensity pulsed ultrasound in bones of osteopenic rats. *Artif Organs*. 2004 Jan;28(1):114-8.

Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res*. 2005 Nov;23(6):1308-14.

Chang K, Chang WH. Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: a prostaglandin E₂-associated process. *Bioelectromagnetics* 2003 apr, 24(3):189-198.

Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*. 2004 Sep;25(6):457-65.

Chavassieux P, Arlot M, Meunier P. Clinical use of bone biopsy. In: *Osteoporosis Second Edition Volume 2*, Marcus R., Feldman D., Kelsey J. eds., Academic Press, San Diego, United States, 2001; 501-509.

Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, Turner CH, Burr DB, Qiu J, Duncan RL. Ca^{+2} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2000; 278:C989–C997.

Cho MR, Thatte HS, Silvia MT, Golan DE. Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. *FASEB J.* 1999 Apr;13(6):677-83.

COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: <http://www.sbpqo.org.br/info/info6.html>; 1991.

Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992 Nov;2(6):285-9.

Crocker G, Dawson RA, Barton CH, MacNeil S. An extracellular role for calmodulin-like activity in cell proliferation. *Biochem J.* 1988 Aug 1;253(3):877-84.

Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Villaggio B, Sulli A, Serio B, Straub RH. New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2003 Nov-Dec;21(6):687-90.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, Vegeto E, Caputi AP, Van De Loo FA, Puzzolo D, Maggi A. Inducible nitric oxide synthase

mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* 2003; 144(3):1098-107.

Da Cunha V, Stefanon I, Mill JG. Role of nitric oxide in mediating cardiovascular alterations accompanying heart failure in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2004 jun, 82(6): 372-379.

Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 2002; 7:18-23.

Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, Murrell GA. Nitric oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2000 Feb;15(2):342-51.

Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery*, 1983; v. 101, p. 153-159.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:235-76.

Duncan RL, Hruska KA. Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *American Journal of Physiology*, 1994; 267: F909-F914.

Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 1995;57:344–58.

Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO* 1997; 16:2271-2281.

Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, Rosen C, Nanes MS, Rubin J. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):751-9.

Feyen JH, Di Bon A, van der Plas A, Löwik CW, Nijweide PJ. Effects of exogenous prostanoids on the proliferation of osteoblast-like cells in vitro. *Prostaglandins*. 1985 Nov;30(5):827-40.

Fitzsimmons RJ, Gordon SL, Kronberg J, Ganey T, Pilla AA. A pulsing electric field (PEF) increases human chondrocyte proliferation through a transduction pathway involving nitric oxide signaling. *J Orthop Res*. 2008 Jun;26(6):854-9.

Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 2007; 40(4):1172-7.

Fuchs RK, Allen MR, Condon KW, Reinwald S, Miller LM, McClenathan D, Keck B, Phipps RJ, Burr DB. Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2008 Sep;19(9):1331-41.

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *Journal of the Physical Society of Japan* 1957, 12(10):1158-1162.

Gan JC, Glazer PA. Electrical stimulation therapies for spinal fusions: current concepts. *Eur Spine J.* 2006 Sep;15(9):1301-11.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *Photochem Photobiol* 2003;70:81-9.

Garland DE, Adkins RH, Matsuno NN, Stewart CA. The effect of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis at the knee in individuals with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 1999 Winter;22(4):239-45.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3):493-501.

Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Mongiorgi R, Gnudi S, Zati A. Experimental surgical model in osteoporosis study. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1993; 69(7-8):453-60.

Giordano N, Battisti E, Geraci S, Fortunato M, Santacroce C, Rigato M, Gennari L, Gennari C. Effect of electromagnetic fields on bone mineral density and

biochemical markers of bone turnover in osteoporosis: a single-blind, randomized pilot study. *Current Therapeutic Research* 2001; 62(3): 187-193.

Grassi F, Fan X, Rahnert J, Weitzmann MN, Pacifici R, Nanes MS, Rubin J. Bone re/modeling is more dynamic in the endothelial nitric oxide synthase(-/-) mouse. *Endocrinology* 2006; 147(9):4392-9.

Gullberg B, Johnell O, Kanis JA. Worldwide projections for hip fracture. *Osteoporosis Int.* 1997;7:407-13.

Guo X, Lu X, Ren H, Levin ER, Kassab GS. Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 May;290(5):H1788-97.

Hamed A, Kim P, Cho M. Synthesis of nitric oxide in human osteoblasts in response to physiologic stimulation of electrotherapy. *Ann Biomed Eng.* 2006 Dec;34(12):1908-16.

Hsu RW, Tai C, Chen CY, Hsu W, Hsueh S. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. *Clin Biomech* 2003;18:S33-9.

Huang CP, Chen XM, Chen ZQ. Osteocyte: the impresario in the electrical stimulation for bone fracture healing. *Med Hypotheses.* 2008-a; 70(2):287-90.

Huang L, Qiu N, Zhang C, Wei HY, Li YL, Zhou HH, Xiao ZS. Nitroglycerin enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via nitric oxide pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2008-b May; 29(5):580-6.

Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, Girgis SI, Konttinen YT, Goodship AE, MacIntyre I, Polak JM. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone* 2003; 32:142-149.

Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 1989 Jan;3(1):31-6.

Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension.* 1990 Nov;16(5):477-83. Review.

Ishida M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Kubo T. Electromagnetic fields: a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 May;466(5):1068-73.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999 Aug;104(4):439-46.

Khan Y, Laurencin CT. Fracture repair with ultrasound: clinical and cell-based evaluation. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90 Suppl 1:138-44.

Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts-correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995a; 217(2):640-8.

Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, Burger EH. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 1995b; 9:441-445.

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104(5):719-30.

Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Bone and Joint Surgery* 1997; 79(7): 961-73.

Leucht P, Kim JB, Currey JA, Brunski J, Helms JA. FAK-Mediated mechanotransduction in skeletal regeneration. *PLoS ONE.* 2007;2:e390.

Li JK, Lin JC, Liu HC, Sun JS, Ruaan RC, Shih C, Chang WH. Comparison of ultrasound and electromagnetic field effects on osteoblast growth. *Ultrasound Med Biol.* 2006 May;32(5):769-75.

Libouban H, Moreau MF, Legrand E, Audran M, Baslé MF, Chappard D. Comparison of histomorphometric descriptors of bone architecture with dual-energy X-ray absorptiometry for assessing bone loss in the orchidectomized rat. *Osteoporos Int.* 2002 May;13(5):422-8.

Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349:1-5.

Lind M, Bunger C. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J* 2001; 10 (Suppl 2): S102-S109.

Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006 Dec;24(6):735-40.

Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Guerkov H, Dean DD, Simon B, Boyan BD. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res.* 2000 Jul;18(4):637-46.

Ma YL, Dai RC, Sheng ZF, Jin Y, Zhang YH, Fang LN, Fan HJ, Liao EY. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *J Biomech.* 2008; 41(6):1324-32.

Mann V, Huber C, Kogianni G, Jones D, Noble B. The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6(4):408-17.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(17): 12231-12234.

Martini L et al. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblast-like cells. *Clin Orthop* 2003 aug, 413:269-280.

Marx RE, Cillo JE Jr, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Dec;65(12):2397-410.

McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? *Endocrine* 2004 feb, 23(1):1-10.

Melton III LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL: Perspective: How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992;7:1005-10.

Mullender MG, Dijcks SJ, Bacabac RG, Semeins CM, Van Loon JJ, Klein-Nulend J. Release of nitric oxide, but not prostaglandin E2, by bone cells depends on fluid flow frequency. *J Orthop Res.* 2006 Jun;24(6):1170-7.

Nagy TR, Prince CW, Li J. Validation of peripheral dual-energy X-ray absorptiometry for the measurement of bone mineral in intact and excised long bones of rats. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep;16(9):1682-7.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* 2001; 285:785-95.

Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284(4):C934-43.

Okruhlicová L, Tribulová N, Bernátová I, Pechánová O. Induction of angiogenesis in NO-deficient rat heart. *Physiol Res.* 2000;49(1):71-6

Omi N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone* 1995, 4: 163S-168S.

Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* 1990;11(6):401-6.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2(6):595-610.

Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest.* 1983; 72(4):1396-409.

Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol.* 1998;275(6 Pt 1):C1591-601.

Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen, J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 1997, 20(3): 207-212.

Pennisi P, D'Alcamo MA, Leonetti C, Clementi A, Cutuli VM, Riccobene S, Parisi N, Fiore CE. Supplementation of L-arginine prevents glucocorticoid-induced reduction of bone growth and bone turnover abnormalities in a growing rat model. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(2):134-9.

Pilla AA. Low intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent?. *J Orthop Sci* 2002, 7(3): 420-428.

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest*. 1999 Nov;104(10):1363-74.

Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br J Rheumatol*. 1997 Aug;36(8):831-8.

Rawlinson SC, Pitsillides AA, Lanyon LE. Involvement of different ion channels in osteoblasts' and osteocytes' early responses to mechanical strain. *Bone*. 1996;19:609-14.

Reich KM, McAllister TN, Gudi S, Frangos JA. Activation of G proteins mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts. *Endocrinology*. 1997;138:1014-8.

Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, Bex FJ. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem*. 2006;281:31720-8.

Rodan GA, Bourret LA, Norton LA. DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science*. 1978 Feb 10;199(4329):690-2.

Ross PD (1996) Osteoporosis: frequency, consequences, and risk factors. Arch Intern Med 156:1399–1411.

Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, Hadjiargyrou M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. The Journal of Bone and Joint Surgery 2001; 83-A(2): 259-270.

Rubin C, Turner AS, Müller R, Mitra E, McLeod K, Lin W, Qin YX. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. J Bone Miner Res. 2002 Feb;17(2):349-57.

Rubin CT, McLeod KJ. Inhibition of osteopenia by biophysical intervention. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (Editors), Osteoporosis. San Francisco: Academic Press; 1996.

Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F, Colasante F, Villa I, Willnecker J, Moro GL, Spreafico LP, Ferretti M, Guidobono F, Marotti G. Ovariectomy sensitizes rat cortical bone to whole-body vibration. Calcif Tissue Int. 2008 Apr; 82(4):316-26.

Samuels A, Perry MJ, Gibson RL, Colley S, Tobias JH. Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. Bone 2001; 29(1):24-29.

Scott G, King JB. A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones. *J Bone Joint Surg Am.* 1994 Jun; 76(6):820-6.

Sert C, Mustafa D, Düz MZ, Akşen F, Kaya A. The preventive effect on bone loss of 50-Hz, 1-mT electromagnetic field in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2002;20(6):345-9.

Sgarabotto M, Baldini M, Dei Cas A, Manotti C, Luciana Barilli A, Rinaldi M, Benassi L, Bacchi Modena A. Effects of raloxifene and continuous combined hormone therapy on haemostasis variables: a multicenter, randomized, double-blind study. *Thromb Res.* 2007;119(1):85-91.

Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, Baron AD. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes.* 2000 May;49(5):684-7.

Shephard RJ. *Envelhecimento, Atividade Física e Saúde.* 1ª Edição, Editora: Phorte Editora; 2003.

Silva OL, Reinbold KA, Pollack SR. The Effects of 1.5 MHz Electric Field Stimulation in Primary Bone Cells Cultures. In: *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine.* Ed.: Martin Blank. San Francisco, San Francisco Press, p.905-908; 1993.

Simonis RB, Parnell EJ, Ray PS, Peacock JL. Electrical treatment of tibial non-union: a prospective, randomised, double-blind trial. *Injury*. 2003 May;34(5):357-62.

Tabrah F, Hoffmeier M, Gilbert F Jr, Batkin S, Bassett CA. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *J Bone Miner Res*. 1990 May;5(5):437-42.

Takahashi K, Yamazaki M, Saisu T, Nakajima A, Shimizu S, Mitsuhashi S, Moriya H. Gene expression for extracellular matrix proteins in shockwave-induced osteogenesis in rats. *Calcif Tissue Int*. 2004 Feb;74(2):187-93.

Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone*. 2007 Nov;41(5):745-51.

Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, Everts V, Klein-Nulend J. Fluid shear stress inhibits TNFalpha-induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res*. 2006; 85(10):905-9.

Tepper JC, Kuo P, McDermott KL. PEMF stimulator for treating osteoporosis and stimulating tissue growth. US patent number 6,839,595 B2 jan 4, 2005. AMEI technologies Inc., Wilmington DE, United States.

Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. 1998; 13(8):1243-50.

Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Sep;82(9):3128-35.

Tomlinson S, MacNeil S, Walker SW, Ollis CA, Merritt JE, Brown BL. Calmodulin and cell function. *Clin Sci (Lond)*. 1984 May;66(5):497-507.

Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I, Sudo M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 1):E840-5.

Turner CH, Owan I, Jacob DS, McClintock R, Peacock M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone*. 1997 Dec;21(6):487-90.

Turner CH, Takano Y, Owan I, Murrell GA. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol*. 1996 Apr;270(4 Pt 1):E634-9.

Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*. 2001; 103(3):255-61.

Vatsa A, Mizuno D, Smit TH, Schmidt CF, MacKintosh FC, Klein-Nulend J. Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res.* 2006 Nov;21(11):1722-8.

Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan;15(1):60-7.

Vezeridis PS, Semeins CM, Chen Q, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 348(3):1082-8.

Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, Huang YT, Huang HC, Chang PR, Sun YC, Yang KD. Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2004 May;145(5):2148-56.

Warden SJ, Bennell KL, Matthews B, Brown DJ, McMeeken JM, Wark JD. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. *Bone.* 2001 Nov;29(5):431-6.

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(6):1015-25.

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998 Jul 15;102(2):274-82.

Wiesmann H, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 28-37.

Wimalawansa SJ, De Marco G, Gangula P, Yallampalli C. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone* 1996; 18(4):301-4.

Wimalawansa SJ. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1117:283-97.

Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, 1892. Translation by Maquet, P & Furlong, R: *The law of bone remodelling*. Berlin, 1986: Springer-Verlag.

World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical report series. Geneva: WHO; 1994. p. 843.

Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1123-31.

Zizic TM. Pharmacologic prevention of osteoporotic fractures. *Am Fam Physician* 2004; 70: 1293-1300.

*Evidências da Ação de Agentes Físicos Sobre
o Metabolismo do Tecido Ósseo e Seus
Potenciais Usos Clínicos*

revisão

RESUMO

A ação de agentes físicos como o laser, o ultra-som pulsado e campos elétrico e eletromagnético (todos de baixa intensidade) no tecido ósseo tem sido muito estudada, revelando que estes são capazes de estimular a osteogênese, acelerar a consolidação de fraturas e aumentar a massa óssea. O uso destas modalidades terapêuticas foi primeiramente baseado na descoberta de que o tecido ósseo é um material piezoelétrico, isto é, que quando deformado torna-se capaz de gerar uma polarização e transformar energia mecânica em elétrica, o que ampliou as possibilidades terapêuticas sobre este tecido. O presente trabalho tem por objetivo apresentar as evidências dos efeitos fisiológicos e discutir sobre os mecanismos de ação destes agentes físicos sobre o metabolismo ósseo, com base em artigos publicados na literatura científica internacional. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005; 49/6:891-896)

Descritores: Ultra-som; Laser; Campo elétrico; Osso; Osteogênese

Ana Paula R. Lirani
Marise Lazaretti-Castro

ABSTRACT

Evidences of Physical Agents Action on Bone Metabolism and their Potential Clinical Use.

The action of physical agents such as low level laser therapy, low-intensity pulsed ultrasound and electrical and electromagnetic fields on bone have been often studied, showing that they are able to promote osteogenesis, accelerate fracture consolidation and augment bone mass. The use of these therapeutic modalities was first based on the finding that bone is a piezoelectric material, that means it can generate polarization when deformed, transforming mechanical energy into electric energy, and this has widen therapeutic possibilities to bony tissue. The present work aims to present evidences of physiologic effects and mechanisms of action of these physical agents on bone metabolism, based on articles published in international scientific literature. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/6:891-896)

Keywords: Ultrasound; Laser; Electric field; Bone; Osteogenesis

Disciplina de Endocrinologia,
Departamento de Medicina,
Universidade Federal de São
Paulo (EPM/UNIFESP), São
Paulo, SP.

A VIDA AINDA CARREGA UMA MARCA de sua origem no fato de que a atividade elétrica é intrínseca a todos os processos vivos, e todo tecido biológico tem alguma forma de reação elétrica sob tensão mecânica. Células e tecidos respondem a uma vasta gama de energias elétrica e magnética externamente aplicadas e são fracos emissores de energia eletromagnética. Esta interação eletromagnética forma a base para as modalidades eletroterapêuticas utilizadas em fisioterapia (1).

A resposta de reparo ósseo pode ser acentuada através de vários métodos, como pela estimulação bioquímica por hormônios ou fatores de crescimento, pelo enxerto ósseo ou pela estimulação física por modalidades mecânicas e eletromagnéticas (2).

Recebido em 01/04/05
Aceito em 04/11/05

Os fisiatras e fisioterapeutas têm se utilizado amplamente destes métodos físicos para tratamento de lesões do sistema músculo-esquelético. Entretanto, as justificativas para estas aplicações fogem ao clínico que não circula por estas áreas da terapêutica. Pelas características particulares do tecido ósseo, os estímulos mecânicos e eletromagnéticos vêm sendo utilizados e investigados para uma série de alterações patológicas.

O presente trabalho tem por objetivo apresentar ao clínico as bases fisiológicas e os mecanismos de ação dos principais agentes físicos já classicamente utilizados na reabilitação, e ainda aqueles que potencialmente poderão ser utilizados para o tratamento e prevenção de alterações no metabolismo ósseo, com base em artigos publicados na literatura científica internacional.

OSSO E PIEZOELETRICIDADE

A palavra piezoeletricidade literalmente significa "eletricidade de pressão": o prefixo piezo é derivado da palavra grega *piezín*, que significa pressão. Piezoeletricidade é uma polarização elétrica produzida por certos materiais, como algumas moléculas e cristais, quando submetidos a uma deformação mecânica. A estrutura do colágeno ósseo preenche as características de material piezoeletrico, que sob deformação mecânica (como a produzida por tração, compressão ou torção) pode sofrer modificações espaciais, produzindo uma polarização elétrica.

O primeiro relato das propriedades piezoeletricas do osso foi feito por Fukada e Yasuda (3), que, em um estudo com ossos humanos, constataram a piezoeletricidade do osso, pois este produziu, sob ação de uma carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo então a energia mecânica em energia elétrica (efeito piezoeletrico direto). Com esta descoberta, nova onda de trabalhos de pesquisa se iniciou, tendo como tema central o conhecimento e o uso da eletricidade como meio para atingir o osso por processos terapêuticos. Desde então, a eletricidade e a necessidade de reparo ósseo têm sido associados (4).

O efeito inverso também existe, isto é, onde o estresse mecânico pode ser produzido por um campo elétrico. O efeito piezoeletrico inverso é obtido quando se aplica um campo elétrico a um material piezoeletrico, como por exemplo o osso, que se deforma mecanicamente. Esta deformação mecânica produzida atinge a atividade celular por estimular o movimento do fluido intersticial no osso, contri-

buindo para o aumento do transporte de nutrientes e metabólitos (5).

O campo elétrico é diretamente induzido por fontes eletromagnéticas e indiretamente pelo movimento mecânico dos fluidos iônicos e efeito piezoeletrico. Pilla (6) propõe que o campo elétrico no meio mecânico do osso em reparo ou remodelamento pode agir como um estímulo de crescimento. Assim, este autor cita que o primeiro mensageiro afetando a atividade celular é o campo elétrico, sugerindo que o reparo ou remodelamento ósseo possa ser modulado utilizando-se sinais mecânicos (ultra-som e vibração) ou eletromagnéticos (campo eletromagnético pulsado e radiação laser).

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E ELETROMAGNÉTICA

A estimulação elétrica para reparo ósseo existe há 3 décadas e é um tratamento aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) americana para retardo de consolidação de fraturas e pseudartrose (2). Em 1984 nos Estados Unidos, Brighton e cols. (7) patentearam um estimulador elétrico não invasivo para prevenir e tratar osteoporose, mas apenas baseado em um estudo com ratos que foram submetidos à neurectomia parcial do nervo ciático.

Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) é um termo restrito a campos eletromagnéticos pulsados que induzem no osso padrões de voltagem de forma de onda similar àquela resultante de deformação mecânica natural (8). PEMF é um agente terapêutico que causa efeito biológico independente de qualquer influência térmica, conforme constatado por Smith e cols. (9), que examinaram os efeitos desta estimulação no diâmetro de arteríolas no músculo cremaster de ratos.

Vários estudos experimentais têm demonstrado que campos eletromagnéticos pulsados podem acelerar o reparo ósseo de fraturas em animais com resultados significativos relativos à atividade osteoblástica em osteotomia de metacarpo de cavalos (10), maior taxa de aposição mineral, menor porosidade no córtex adjacente à linha da osteotomia e melhores propriedades mecânicas em tíbias de cães (11), todos tratados com PEMF em relação aos controles.

Modelos experimentais de retardo de consolidação permitiram a demonstração da eficácia dos PEMFs em ratos (12) e em coelhos (13). Os PEMFs podem causar uma redução significativa na perda de volume ósseo após o tratamento (12), bem como maiores velocidades de reparo em até 4 semanas, aumentando a resistência mecânica óssea (13).

Trabalhos com cultura de células ósseas submetidas à estimulação elétrica produziram, em células de metacarpo de bovinos, uma aceleração da formação mineral óssea (14) e em células de calvária de ratos recém-natos, um aumento da proliferação de osteoblastos (15), quando comparados ao grupo controle. Além disso, Diniz e cols. (16) relataram que os efeitos estimulatórios do PEMF na proliferação e diferenciação de osteoblastos são mediados pelo aumento da síntese de óxido nítrico.

Brighton e cols. (17), em um estudo com campos elétricos e eletromagnéticos, indicaram que os sinais elétricos estimulam a proliferação celular em cultura de células ósseas. Este estudo ainda cita que este aumento na proliferação seja decorrente de um aumento na concentração citoplasmática de cálcio, que ocorre por dois mecanismos: pela abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes, ou pela mobilização do cálcio contido em compartimentos intracelulares para o citoplasma, conforme demonstrado com o uso de inibidores metabólicos específicos.

Em uma investigação clínica, Bassett e cols. (18) analisaram o uso de PEMF no tratamento de retardo de consolidação óssea, juntamente com enxerto ósseo, em pacientes adultos, por uma média de 4 meses, e obtiveram cura em 87% dos casos quando o campo eletromagnético pulsado foi utilizado, quando comparado com os controles sem tratamento.

Evidências de que estímulos mecânicos ou elétricos de relativa baixa amplitude e alta frequência podem influenciar a formação e reabsorção ósseas sugerem que estas modalidades possam ser usadas clinicamente para inibir ou reverter osteopenias (5).

Em um estudo cego e randomizado, 40 pacientes com osteoporose pós-menopausa foram expostas ao campo eletromagnético pulsado (PEMF) (100Hz) (n= 20) ou placebo (n= 20) por 1h/dia, 3 vezes por semana por 3 meses (o campo gerado expunha a coluna vertebral e pelve). No grupo tratado observou-se um aumento significativo na osteocalcina sérica e no peptídeo C-terminal do pró-colágeno tipo I (PICP), que são marcadores da formação óssea. Estes resultados sugerem que PEMFs podem estimular a osteogênese em três meses de tratamento, por aumentar a atividade osteoblástica, em mulheres pós-menopausadas com osteoporose (19).

Pouco se sabe sobre a eficácia do campo elétrico ou eletromagnético quando comparados a outras modalidades terapêuticas como o laser e o ultra-som, também usados para acelerar o processo de reparo ósseo, e em qual fase do reparo ósseo cada um destes agentes físicos é mais eficaz.

ULTRA-SOM

Desde quando Fukada e Yasuda (3) constataram a piezoelectricidade do osso, preconizou-se o uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade (LIPUS - *low intensity pulsed ultrasound*) (1,5MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm²) para acelerar o reparo ósseo com base na semelhança do mesmo com o processo natural de cura de fraturas (20). O processo natural de reparo de fraturas começa quando os restos celulares e coágulos sanguíneos são removidos por macrófagos, e há proliferação de endóstio e perióstio próximo ao local da fratura formando um colar conjuntivo que dá origem a um tecido ósseo imaturo por ossificação endocondral e intramembranosa, formando então o calo ósseo. A descarga de peso e outros estímulos mecânicos determinam a remodelação deste calo ósseo, fazendo com que o tecido ósseo primário seja reabsorvido por osteoclastos e substituído por tecido ósseo lamelar formado por osteoblastos (21). Muitos trabalhos experimentais (20,22-24) e clínicos (4,25-27) têm sido publicados desde então e, atualmente, esta modalidade terapêutica é bem estabelecida, aprovada pela FDA americana e amplamente utilizada.

Segundo Duarte (20), o ultra-som pulsado atinge o tecido ósseo por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante, o processo de formação do osso é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente. No entanto, o mecanismo de interação do ultra-som com o tecido ósseo ainda é alvo de especulação científica, pois há autores que acreditam que o ultra-som possa exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (22), ou que as ondas de pressão geradas pelo ultra-som possam mediar a atividade biológica diretamente pela deformação mecânica da membrana celular ou, indiretamente, pelo efeito elétrico causado por esta deformação (26).

Existem evidências de que campos elétricos variáveis, com frequência semelhante àquela do ultra-som utilizado em estimulação de formação óssea, produzem aumento na incorporação de cálcio iônico intracelular em culturas de células ósseas, através da ativação de canais de transporte de cálcio do tipo L (sensíveis à variação de tensão elétrica) presentes na membrana plasmática (28). Mais tarde, foi determinado que os canais de transporte de cálcio do tipo L são mecano-sensíveis, ou seja, respondem a estímulos mecânicos (29,30).

Através de histomorfometria óssea demonstrouse que a estimulação ultra-sônica pode acelerar a regeneração trabecular óssea em fêmures de ratos *in vitro*

(31), em tíbias de ratos *in vivo* com fratura recente (32) e em modelo experimental de não-união de fratura de tíbia de ratos (22).

Chang e cols. (33) investigaram os efeitos do ultra-som pulsado e das microondas no reparo de fraturas em coelhos e obtiveram aumento na neoformação óssea e na resistência à torção apenas no grupo tratado com ultra-som, o que os permitiu afirmar que não foi o efeito térmico que estimulou a formação óssea.

Em modelo experimental de pseudartrose de tíbia de ratos (22), o ultra-som pulsado de baixa intensidade foi utilizado com sucesso para acelerar o processo de reparo ósseo. Após seis semanas de tratamento diário (20 minutos por dia), 50% das fraturas tratadas foram consolidadas, enquanto nenhuma fratura do grupo controle obteve cura neste intervalo de tempo. O ultra-som também pode melhorar as propriedades mecânicas de ossos fraturados de ratos diabéticos, como demonstrado em um estudo de Gebauer e cols. (23).

Diversos estudos clínicos comprovam a eficácia do ultra-som no reparo ósseo, como o de Heckman e cols. (26), que verificaram seu efeito na cura de fraturas corticais de tíbia de 66 pacientes como um complemento ao tratamento ortopédico convencional. O tratamento se iniciava 7 dias após a fratura e consistia em uma aplicação diária de 20 minutos por 20 semanas ou até que o avaliador considerasse a fratura curada. Ao final do tratamento houve uma diminuição estatisticamente significativa no tempo total de cura clínica e radiológica no grupo tratado. Cento e vinte dias após a fratura, 88% das fraturas do grupo tratado estavam curadas, comparadas com 44% do grupo placebo.

Um estudo clínico multicêntrico, prospectivo, randomizado e duplo-cego com controle placebo foi conduzido por Kristiansen e cols. (27) para testar a eficácia do LIPUS na redução do tempo de cura radiológica de fraturas de rádio que foram tratadas com manipulação e gesso. Trinta pacientes receberam o tratamento que se iniciou sete dias após a fratura, e foi realizado por 20 minutos diários por 10 semanas, e outros trinta pacientes receberam tratamento placebo. O tempo de reparo foi significativamente menor no grupo tratado: 61 ± 3 dias comparado com 98 ± 5 dias no grupo placebo.

É interessante notar que ambos estudos de Kristiansen e cols. (27) e Heckman e cols. (26) obtiveram uma redução no tempo de reparo das fraturas muito semelhante com a utilização da estimulação ultra-sônica. Ambas foram em torno de 40% quando comparados aos grupos não tratados.

Outras investigações clínicas ainda tiveram sucesso com o uso do LIPUS para tratar fraturas complexas de tíbias (34) e fraturas de alto impacto de ossos longos (35).

O mecanismo específico pelo qual o ultra-som pulsado de baixa intensidade acelera o reparo ósseo continua assunto de especulação científica; no entanto, em termos de mecanismos físicos, o ultra-som pode exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (22). Duarte (20) sugeriu a investigação do efeito piezoelétrico com o objetivo de esclarecer se este efeito em ossos *in vivo* é apenas devido ao material como transdutor ou se as células também se comportam como um transdutor num fenômeno cooperativo.

LASER

A aceleração do reparo ósseo causada pela terapia laser de baixa intensidade (LLLT - *Low level Laser Therapy*) é freqüentemente citada na literatura (36-46), principalmente em casos de fraturas experimentais, mas seu uso em humanos ainda não foi aprovado pela FDA.

Silva Júnior e cols. (41) estudaram a ação do LLLT em um modelo de defeito ósseo em fêmur de ratos, e a morfometria computadorizada demonstrou maior mineralização 7 dias após a cirurgia no grupo tratado. A aplicação diária de LLLT por mais de sete dias acelera a neoformação trabecular de acordo com estudo feito com fratura de tíbia de ratos (38). Em outra investigação com ratos, os animais com fratura transversal total no terço médio da tíbia (fixação interna com fio de Kirschner) que receberam LLLT apresentaram carga máxima e rigidez do calo da tíbia significativamente maiores que no grupo controle (37). Além disso, em um estudo feito com fraturas de tíbia em 292 ratos, Barushka e cols. (39) demonstraram que a LLLT pode aumentar a atividade e o número de osteoblastos e osteoclastos, como observado no incremento da atividade de fosfatase alcalina e fosfatase ácida tartrato-resistente.

Lirani (32) demonstrou que, em fraturas de tíbia de ratos, a terapia laser é capaz de acelerar o processo de reparo. Tíbias de ratos com osteotomia parcial submetidas à LLLT apresentaram significância estatística quanto à resistência à carga em ensaio mecânico de flexão (44) e maiores número e superfície de osteoblastos e volume e superfície de osteóide na análise histomorfométrica (32), indicando aceleração do processo de reparo ósseo com predomínio de formação óssea no 19º dia pós-cirúrgico.

De acordo com Nicolau e cols. (43), a LLLT aumenta a atividade de reabsorção e formação óssea em fraturas de fêmures de ratos. Cinco dias após a cirurgia, o volume ósseo e a superfície de osteoclastos

do grupo tratado eram maiores que o controle, e em quinze dias pós-cirúrgicos a superfície de osteoblastos e a taxa de aposição mineral eram também estatisticamente maiores no grupo tratado com laser. A LLLT estimula o crescimento da área trabecular e a concomitante invasão de osteoclastos durante a primeira semana de tratamento pós-osteotomia experimental de tibia, e acelera a organização de colágeno da matriz ao final da segunda semana (42).

Um trabalho que avaliou os efeitos da LLLT em células osteoblásticas humanas utilizou doses diárias de laser GaAlAs (830nm, 90mW, densidades de energia de 1,7 a 25,1J/cm²) por até 10 dias, e o aumento do cálcio intracelular indicou que estas células respondem à LLLT (47). A radiação laser em estágios precoces da cultura estimula significativamente a proliferação celular, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão gênica de osteocalcina (48), o que não ocorreu em datas posteriores (além de 21 dias) na cultura de *osteoblast-like cells* isoladas da calvária de fetos de ratos que foram irradiados com laser Ga-Al-As (830nm, 500mW, 3,82J/cm²). Isto sugere que o estímulo à formação óssea decorrente da LLLT atue apenas em estágios proliferativos e precoces da diferenciação de precursores imaturos, e não em estágios tardios.

CONCLUSÃO

Existem muitas evidências científicas que demonstram os efeitos biológicos positivos do laser, ultra-som e do campo elétrico, todos de baixa intensidade, sobre o tecido ósseo. No entanto, comparar os efeitos destas diferentes modalidades terapêuticas no osso tem sido uma tarefa árdua, pois os parâmetros, tempos de tratamento e doses de energia utilizados em cada estudo são muito distintos. Além disso, é difícil saber qual a dose de energia necessária para estimular a osteogênese em diferentes estados biológicos como, por exemplo, no osso normal, naquele com atraso de consolidação ou no osteoporótico. Apesar dos comprovados efeitos positivos destas modalidades na promoção da osteogênese, estudos precisam ser realizados a fim de definir os melhores parâmetros como tempos de tratamento e doses de energia, além de dados de segurança e possíveis maneiras de sensibilizar a resposta biológica à estimulação mecânica e elétrica sobre as várias qualidades de osso.

A energia eletromagnética pode ser uma forma econômica de tratar uma série de alterações ósseas de maneira eficiente. Para que isto ocorra, é fundamental a disseminação destes conhecimentos já amplamente

comprovados em ensaios experimentais e em *anima nobile*. As questões que abordem segurança para seu uso crônico na espécie humana, entretanto, necessitam ser melhor estabelecidas em estudos a longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Charman RA. Bioelectricity and electrotherapy - towards a new paradigm? Introduction. *Physiotherapy* 1990;76:502-3.
2. Lind M, Bunge C. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J* 2001;10:S102-9.
3. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan* 1957;12:1158-62.
4. Duarte LR, Xavier CAM. Estimulação ultrassônica do calo ósseo. Aplicação clínica. *Rev Bras Ortop* 1983; 18:73-80.
5. Rubin CT, McLeod KJ. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. Academic press, 1996. p.351-71.
6. Filla AA. Low intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? *J Orthop Sci* 2002;7:420-8.
7. Brighton et al. Uspto patent full-text and image database. United States patent number 4,467,808 United States Patent 1984. Acesso a <http://patft.uspto.gov/> em janeiro de 2005.
8. Bassett CA. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *Crit Rev Biomed Eng* 1989;17:451-529.
9. Smith TL, Wong-Gibbons D, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res* 2004;22:80-4.
10. Canè V, Zaffe D, Cavani F, Botti P, Soana S. PEMFs modulate the enzymatic activity during the bone repair process. *Bone* 1996;19:133S.
11. Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwarzf J, Chao EYS. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res* 2002;20:1106-14.
12. Ibiwoye MO, et al. Bone mass is preserved in a critical-sized osteotomy by low energy pulsed electromagnetic fields as quantitated by in vivo micro-computed tomography. *J Orthop Res* 2004;22:1086-93.
13. Hsu RW, Tai C, Chen CY, Hsu W, Hsueh S. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. *Clin Biomech* 2003;18:S33-9.
14. Wiesmann HP, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:28-37.
15. Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 2004;25:457-65.
16. Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 2002;7:18-23.

17. Brighton CT, Wang W, Seldes R, Zhang G, Pollack S. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg* 2001;83-A:1514-23.
18. Bassett CA, Mitchell SN, Schink MM. Treatment of therapeutically resistant non-unions with bone grafts and pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg* 1982;64:1214-20.
19. Giordano N, et al. Effect of electromagnetic fields on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in osteoporosis: a single-blind, randomized pilot study. *Curr Therop Res* 2001;62:187-93.
20. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 1983;101:153-9.
21. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1990. p.113-4.
22. Takikawa T. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med* 2001;20:197-205.
23. Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res* 2002;20:587-92.
24. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res* 2001;16:671-80.
25. Heckman JD, Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis* 1997;56:63-72.
26. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kiloayne RF. Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg* 1994;76-A:26-34.
27. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:961-73.
28. Silva OL, Reinbold KA, Pollack SR. In: Martin Blank, editor. *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. San Francisco Press, 1993;905-8.
29. Duncan RL, Hruska KA. Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am J Physiol* 1994;267:P909-14.
30. Chen NX, et al. Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2000;278:C989-97.
31. Sun J, et al. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. *J Biomed Mater Res* 1999;46:253-61.
32. Lirani APR. Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato. Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
33. Chang WH, et al. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. *Bioelectromagnetics* 2002;23:256-63.
34. Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH. Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:389-95.
35. Lerner A, Stein H, Soudry M. Compound high-energy limb fractures with delayed union: our experience with adjuvant ultrasound stimulation (exogen). *Ultrasonics* 2004;42:915-7.
36. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7:36-45.
37. Luger EJ, et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med* 1998;22:97-102.
38. Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Laser effects on osteogenesis. *Applied Surface Science* 2000;154-155:548-54.
39. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone* 1995;16:47-55.
40. Guzzardella GA, et al. Laser technology in orthopedics: preliminary study on low power laser therapy to improve the bone-biomaterial interface. *Int J Artif Organs* 2001;24:898-902.
41. Silva Junior, et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:83-7.
42. Garavella-Freitas I, et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *Photochem Photobiol* 2003;70:81-9.
43. Nicolau RA, et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 2003;18:89-94.
44. Lirani APR, Silva OL. Propriedades mecânicas de fraturas ósseas submetidas a terapia laser de baixa intensidade. *Rev Bras Biomec* 2004;5:19-24.
45. Rochkind S, et al. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. *Photomed Laser Surg* 2004;22:249-53.
46. Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:693-700.
47. Coombe AR, et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthop Res* 2001;4:3-14.
48. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22:347-54.

Endereço para correspondência:

Ana Paula Rebucci Lirani
Rua Gonçalves da Cunha 130, apto. 74
04140-040 São Paulo, SP
E-mail: analirani@fcr.epm.br

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética – UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 12 de maio de 2006.
CEP 0530/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANA PAULA REBUCCI LIRANI GALVÃO
Co-Investigadores: Cassia de Toledo Bergamaschi, Orivaldo Lopes da Silva, Marise Lazaretti Castro (orientadora)
Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Uso do campo elétrico de baixa intensidade em ratas ovariectomizadas: efeitos sobre o tecido ósseo e sistema cardiovascular e sua correlação com a produção de óxido nítrico".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental, categoria B.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos do campo elétrico pulsado de baixa intensidade sobre o sistema esquelético e cardiovascular em ratas ovariectomizadas, correlacionando-os com a produção de óxido nítrico.

RESUMO: Estudo com 80 ratos wistar. Anestésico: ketamina e xilazina, uretana. Analgésico: ketoprofeno. Eutanásia: ketamina e xilazina. Quarenta animais, distribuídos em 4 grupos, serão submetidos à ovariectomia bilateral. Outras 20 ratas serão submetidas ao mesmo procedimento, mas sem a retirada dos ovários. As ratas serão divididas em 6 grupos: grupos OVX e Sham não receberão qualquer tratamento. Os grupos OVX L-NAME e sham L-NAME receberão 06mg/kg diários de L-NAME por gavagem. O grupo OVX EE, as ratas serão submetidas a um campo elétrico pulsado de baixa intensidade em 60 sessões de 20 minutos diários a partir do 7 dia pós-cirúrgico, 5 vezes por semana. A mesma estimulação elétrica será dada ao grupo OVX EE L-NAME. Todos os animais serão submetidos à densitometria óssea, canulação para aferição de parâmetros hemodinâmicos, coleta de sangue para análise dos níveis de osteocalcina, cálcio ionizado e óxido nítrico, coleta de urina para dosagem de óxido nítrico e extração de tíbias para análise histomorfométrica e fêmures para ensaio mecânico..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, visando avaliar o efeito do campo elétrico pulsado de baixa intensidade, no sistema ósseo e cardiovascular, em ratas ovariectomizadas.

MATERIAL E MÉTODO: Descreve os procedimentos, utilizando metodologia de domínio da equipe envolvida.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo - R\$ 1315,50.

CRONOGRAMA: 36 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 7/5/2007 e 1/5/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

Continuação - Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente.

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo

Anexo 3 - Exemplo de Exame de Densitometria Óssea em Rato

UNIFESP-DISC. DE ENDOCRINOLOGIA

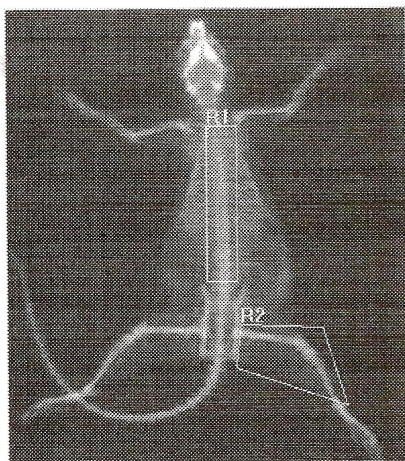
RUA BORGES LAGOA, 800
SAO PAULO, SP

Name: OVX L-NAME 5
Patient ID: 00000009375
DOB:

Sex: Female
Ethnicity:

Height:
Weight:
Age:

Referring Physician: ANA PAULA



k = 1.198, d0 = 66.1
279 x 160

Scan Information:

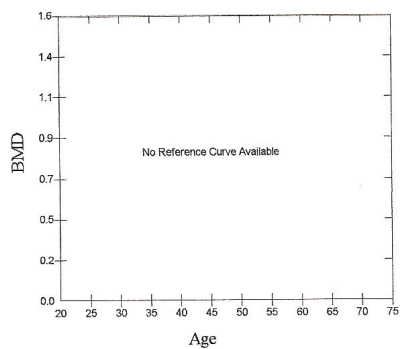
Scan Date: 14 March 2006 ID: N0314060L
Scan Type: a Rat WB
Analysis: 03 May 2006 12:59 Version 12.3:3
Rat Whole Body
Operator: GENI
Model: Discovery A (S/N 45274)
Comment:

DXA Results Summary:

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)
GLOBAL	52.55	6.88	0.131
R1	8.31	1.17	0.141
R2	4.24	0.52	0.123
Net	12.54	1.69	0.135

Region	Fat (g)	Lean+BMC (g)	Total Mass (g)	% Fat
GLOBAL	30.8	166.2	197.0	15.7
R1	5.4	28.8	34.2	15.8
R2	1.6	11.7	13.3	11.9
Net	7.0	40.5	47.5	14.7

RBAR101



HOLOGIC®

Anexo 4 – Protocolo de Imunohistoquímica para Óxido Nítrico Sintase

Protocolo baseado em Basso & Heersche (2006).

Preparar Soluções:

Solução Tris HCl (para 200mL):

- 1.2g de tris (tris base – hidroximetilaminometano, ref 1.08382.0100, Merck)
- 50mL de água destilada
- 38.4mL de HCl 0.2N
- Completar com água destilada até 200mL

TBS (100mL):

- 100mL de tris HCl
- 0.9g de NaCl
- 0.01g de BSA (A-7888, Sigma)

Solução de Glicina:

- 100 mM em tampão tris 0.5M
- 0.075g de glicina diluído em 10mL de TBS

Solução de Tripsina:

- 0.2g de tripsina 250 (Trypsin 1:250 – tissue culture grade, ref 0458-50G, Amresco)
- 0.2g de cloreto de cálcio
- 1M de hidróxido de sódio (pH 7.8) (2.5g)
- TBS (62.5 mL)

TBS Tween:

- 25mL de TBS
- Tween 0.05% (10 μ L de tween 20 puro) (Tween 20, ref 822184, Merck)

Continuação - Imunohistoquímica para Óxido Nítrico Sintase

1º dia

Lâmina contendo corte histológico (espessura de 5 ou 7µm) de tecido ósseo descalcificado incluso em parafina.

1) Banhos:

- 3 x 5min - metilciclohexano (ou xilol)
- 2 x 5 min - etanol 100%
- 1 x 10 min - etanol 70%
- 2 x 5 min - água destilada

2) Limpar cuidadosamente com papel toalha (ref 7102, Kimtech) sem tocar no corte histológico. Circundar corte com caneta *Dako pen* (ref S2002, Dako).

3) Colocar gotas cobrindo o corte:

- Solução Tris HCl – 5 min
- Solução de Glicina – 20 min
- Solução de Tripsina – 30 min
- Peroxidase blocking (reagent ready to use, ref S2001, Dakocytomation, Dako) - 15 min
- Solução de bloqueio (TBS + 10% soro de cabra) - 20min
- Diluição eNOS/ iNOS – 1: 100 em TBS+1% soro de cabra (normal goat serum, ref X0907, Dako)

Obs: Foram utilizados os anticorpos *rabbit polyclonal to iNOS* (ab3523, Abcam) e *rabbit polyclonal to eNOS* (ab5589, Abcam).

4) Deixar na câmara fria a 4º C durante uma noite.

Continuação - Imunohistoquímica para Óxido Nítrico Sintase

2º dia

4) Preparo dos cortes:

- Lavar cortes cuidadosamente com TBS tween
- Banhos no TBS tween (3 x 15 min)
- 01 gota do anticorpo secundário¹ em cada corte (com exceção do controle negativo, que será coberto por TBS) 25 min
- Lavar cortes com TBS tween
- Banhos (3 x 15 min) no TBS tween
- 01 gota de DAB preparado² (1 gota de DAB chromogene+ 1 mL tampão) 5 a 15 min. Cobrir com papel alumínio durante esta etapa
- Lavar com água destilada
- Cobrir cortes com gotas de hematoxilina de Mayer (1/3 hematoxilina de Mayer + 2/3 água destilada - filtrar) 30 seg
- Banho em água corrente (3 x 5 min)

5) Desidratar e montar:

- Banho em álcool 70% (1 x 10 min)
- Banho em álcool 100% (1 x 10 min)
- Banho em metilciclohexano (2 x 10 min)
- Montar lâmina com lamínula e Eukitt (*mounting medium for microscope preparations stable*, R10-20/21-28, S925-27)

¹Kit HRP: Kit Dakocytomation envision R + system HRP para uso com anticorpos primários de coelho (ref K4010, Dako). Este kit contém: peroxidase block, DAB substrate buffer + DAB chromogen e labeled polymer HRP anti rabbit. Este kit também será utilizado na técnica de Caspase.

²Usar luvas para manipular DAB. Tudo o que tiver contato com DAB, deixar de molho em água com cloro antes de descartar.

Anexo 5 - Protocolo de Imunohistoquímica para Apoptose – Técnica de Caspase

Protocolo baseado em Follet e cols. (2007).

Preparar Soluções:

PBS para 1 litro:

- 8.18g NaCl
- 0.20g KCl
- 0.20g KH₂PO₄
- 2.15g Na₂HPO₄ · 7H₂O (Fosfato de Sódio, Dibasic, 7-Hydrate, Crystal)
- 800mL de água destilada (para começar, então adicionar sais e completar até 1 litro com mais água destilada). pH 7.4.

Solução 3% H₂O₂ / metanol:

- 100 c de H₂O₂ 30% (UN 2014 – R:22-41S26-29, Merck)
- 900 µL de metanol

Solução de bloqueio:

- 5mL de PBS
- 75 µL de soro de cabra normal (VectaStain ABC kit)

PBS/T/BSA:

- 100 mL PBS
- 0.3mL de Triton x-100 (ref 11869, Merck)
- 0.1g de BSA

Solução do anticorpo primário (preparar na hora de usar – para 10 cortes):

- 960 µL de PBS/T/BSA
- 40 µL de caspase-3 ((H-277); SC-7148, rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, Estados Unidos).

Continuação - Imunohistoquímica - Técnica de Caspase

PBS Tween:

- 100 mL de PBS
- 0.1 mL de Tween 20 (cuidado com medida pois tween é extremamente viscoso)

1º dia

Lâmina contendo corte histológico (espessura de 5 ou 7µm) de tecido ósseo descalcificado incluso em parafina.

1) Banhos:

- 3 x 5min - metilciclohexano (ou xilol)
- 2 x 5 min - etanol 100%
- 1 x 3 min - etanol 90%
- 1 x 3 min - etanol 80%
- 1 x 3 min - etanol 70%
- Deixar lâminas em PBS

2) Limpar cuidadosamente sem tocar no corte histológico. Circundar corte com caneta *Dako pen* (ref S2002, Dako). Realizar os próximos banhos:

- 2 x 5 min – metanol 100%
- 1 x 5 min – metanol 70%
- 2 x 5 min – PBS
- 1 x 10 min – PBS + 0.3% Triton X-100
- 1 x 5 min – PBS

3) Colocar gotas cobrindo o corte:

- Limpar cuidadosamente os cortes
- 5 min na solução 3% H₂O₂ / metanol

Continuação - Imunohistoquímica - Técnica de Caspase

- Retirar solução acima e cobrir com PBS por 5 min
- Retirar PBS (com toalha de papel) e aplicar solução de bloqueio por 30 min (câmara úmida)
- Drenar solução de bloqueio e aplicar solução do anticorpo primário e encubar em solução por uma noite (mínimo de 16hs) a 4º C

2º dia

4) Preparo dos cortes:

- Retirar solução do anticorpo primário e lavar 4-5 vezes com PBS Tween
- Limpar com toalha de papel e aplicar gotas do anticorpo secundário (kit HRP²) - 45 min
- Retirar solução do anticorpo secundário e lavar 4-5 vezes com PBS Tween
- Limpar corte e aplicar solução DAB³. Observar mudança de cor (o tempo varia de 20 a 60 seg para corte de tíbia de rato)
- Lavar várias vezes com PBS para interromper coloração com DAB
- Deixar cortes cobertos com PBS

5) Contra-colorir, desidratar e montar (banhos):

- Solução de verde de metil 5% (3 min)
- Etanol 95% - 10 mergulhos
- Etanol 100% - 10 mergulhos
- Metilciclohexano - 10 mergulhos e depois deixar até montar a lâmina.
- Montar lâmina com lamínula e Eukitt.

³Produto do kit HRP – mesmo kit citado no anexo 4.

Anexo 6 - Protocolo de Imunohistoquímica para Apoptose - Técnica de TUNEL

Protocolo do usuário (Rev. 10 agosto de 2005) do kit *Klenow FragEL DNA Fragmentation Detection Kit* (cat. No. QIA21, CalbiochemEMD Bioscience, afiliada à Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Preparar soluções: ³

Solução de Proteinase K:

- 2mg/mL de Proteinase K⁴ 1:100 em 10mM de Tris pH 8*
- Misturar 1 µL de 2mg/mL de Proteinase K com 99 µL de 10mM de Tris por corte

* Tris pH 8 = 0.60g de Tris em 500mL de água destilada

Solução 1X Klenow Equilibration Buffer:

- 10 µL de 10X Klenow Equilibration Buffer⁴
- 90 µL de água destilada

Solução Klenow Labeling Reaction Mixture:

- Centrifugar com vortex o tubo de *Klenow Labeling Reaction Mix*⁴ e a enzima Klenow⁴ separadamente, antes de usar
- Para cada corte histológico, transferir para um tubo de centrifuga limpo (mantido no gelo): 58.4 µL de *Klenow Labeling Reaction Mix* e 1.6 µL da enzima Klenow

Conjugado Diluído (para um corte):

- 2 µL de 50X *Conjugate*⁴
- 98 µL de *Blocking Buffer*⁴

⁴ Incluso no kit *Klenow FragEL DNA Fragmentation Detection Kit*

Continuação - Imunohistoquímica - Técnica de TUNEL

Obs: Para cortes de tibia de ratos, 1mL de qualquer solução é suficiente para cobrir 24 corte histológicos, desde que bem demarcados com caneta *Dako pen*.

Protocolo:

Lâmina contendo corte histológico (espessura de 5 ou 7 μ m) de tecido ósseo descalcificado incluso em parafina.

1) Banhos:

- 3 x 5min - metilciclohexano (ou xilol)
- 2 x 5 min - etanol 100%
- 1 x 3 min - etanol 90%
- 1 x 3 min - etanol 80%
- 1 x 3 min - etanol 70%
- Deixar lâminas em PBS ou TBS

2) Limpar cuidadosamente sem tocar no corte histológico. Circundar corte com caneta *Dako pen* (ref S2002, Dako).

3) Permeabilização:

- Cobrir todo o corte com a solução de Proteinase K por 20 min
- Lavar com TBS
- Retirar excesso de líquido e secar ao redor do corte

4) Controle Positivo:

- Cobrir o corte controle positivo (do kit TUNEL) com 1 μ g/mL de DNaseI (RNase Free, cat AM 2222, Ambion – the RNA Company) diluído em 1X TBS/ 1 mM MgSO₄* (deixar as outras laminas em TBS) por 20 min
- Lavar com TBS

Continuação - Imunohistoquímica - Técnica de TUNEL

- Retirar excesso de líquido e secar ao redor do corte

*1X TBS/ 1 mM MgSO₄ = 0.012g de MgSO₄ diluído em 50mL de TBS.

Continuação – Imunohistoquímica - Técnica de TUNEL

5) Inativação de Peroxidases Endógenas:

- Cobrir todo o corte com 3% H₂O₂ / metanol (já citado no protocolo de caspase) por 5 min
- Lavar com TBS
- Retirar excesso de líquido e secar ao redor do corte
- Cobrir todo o corte com *1X Klenow Equilibration Buffer* por 20 min
- Retirar excesso de líquido, com cuidado para não tocar no corte
- Aplicar a Solução *Klenow Labeling Reaction Mixture*
- Cobrir cada lâmina com parafilme ou cobrir tudo com papel alumínio
- Colocar lâminas em camara fria e incubar a 37° C por 1.5 horas
- Lavar com TBS
- Cobrir cortes com *Stop Solution* (no kit). Incubar por 5 min em temperatura ambiente
- Lavar com TBS
- Retirar excesso de líquido e secar ao redor do corte

6) Detecção:

- Cobrir cortes com *Blocking Buffer* por 10 min
- Retirar cuidadosamente o *Blocking Buffer* e aplicar gotas do conjugado diluído nos cortes
- Colocar lâminas em câmara úmida e incubar em temperatura ambiente por 30 min

Continuação - Imunohistoquímica - Técnica de TUNEL

- Preparar solução de DAB 5 min antes de acabar a etapa anterior (1 gota de DAB do kit HRP diluído em 1mL do buffer)
- Lavar com TBS
- Retirar excesso de líquido e secar ao redor do corte
- Cobrir cortes com solução de DAB por 10 a 15 min
- Lavar com água destilada

7) Contracoloração (banhos):

- Solução de verde de metil 5% (3 min)
- Enxugar ao redor do corte com toalha de papel
- Etanol 100% - 2-4 mergulhos
- Enxugar ao redor do corte com toalha de papel
- Etanol 100% II - 2-4 mergulhos
- Enxugar ao redor do corte com toalha de papel
- Metilciclohexano (ou xilol) - 2-4 mergulhos
- Enxugar ao redor do corte com toalha de papel
- Montar lâmina com lamínula e Eukitt.

Anexo 7 – Resultados: Densitometria Óssea

GRUPO SHAM

Ratas	DMO total inicial (g/cm ²)	DMO total final (g/cm ²)	Δ% DMO total	DMO coluna inicial (g/cm ²)	DMO coluna final (g/cm ²)	DMO m.inf. Inicial (g/cm ²)	DMO m.inf. Final (g/cm ²)
1	0,1377	0,1449	5,2288	0,1290	0,1480	0,1070	0,1320
2	0,1385	0,1473	6,3538	0,1190	0,1560	0,1060	0,1330
3	0,1389	0,1524	9,7192	0,1310	0,1670	0,1090	0,1400
4	0,1358	0,1486	9,4256	0,1250	0,1390	0,1170	0,1330
5	0,1406	0,1505	7,0413	0,1410	0,1600	0,1030	0,1250
6	0,1460	0,1510	3,4247	0,1500	0,1680	0,1240	0,1280
7	0,1280	0,1442	12,6563	0,1470	0,1430	0,1350	0,1530
8	0,1376	0,1551	12,7180	0,1440	0,1470	0,1170	0,1260
9	0,1384	0,1513	9,3208	0,1460	0,1410	0,1200	0,1290
10	0,1370	0,1490	8,7591	0,1280	0,1440	0,1090	0,1340
Média	0,1379	0,1495	8,43	0,1360	0,1511	0,1147	0,1333
DP	0,005	0,001	1,062	0,011	0,003	0,010	0,002

GRUPO SHAM

Ratas	CMO total inicial (g)	CMO total final (g)	Δ% CMO total	CMO total+massa magra final (g)	Massa inicial (g)	Massa final (g)
1	7,35	8,57	16,73	197,00	206,00	268,30
2	6,98	8,70	24,67	203,50	215,00	266,00
3	7,06	8,42	19,39	205,00	220,00	269,00
4	6,69	7,85	17,37	189,20	205,00	252,00
5	7,31	8,73	19,49	203,80	221,00	255,40
6	8,53	8,49	-0,55	203,30	213,00	260,60
7	8,62	7,14	-17,08	177,30	201,00	253,00
8	6,36	8,59	35,17	209,00	211,00	239,30
9	7,57	9,38	23,86	208,40	220,00	254,00
10	7,35	9,88	34,44	209,60	206,00	218,20
Média	7,38	8,69	17,35	206,82	211,80	253,58
DP	0,77	0,17	15,39	11,09	7,28	9,55

Continuação – Resultados: Densitometria Óssea

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	DMO total inicial (g/cm ²)	DMO total final (g/cm ²)	Δ% DMO total	DMO coluna inicial (g/cm ²)	DMO coluna final (g/cm ²)	DMO m.inf. Inicial (g/cm ²)	DMO m.inf. Final (g/cm ²)
1	0,1250	0,1510	20,8000	0,1300	0,1580	0,1090	0,1420
2	0,1290	0,1540	19,3798	0,1350	0,1570	0,1110	0,1420
3	0,1390	0,1530	10,0719	0,1430	0,1620	0,1250	0,1320
4	0,1260	0,1510	19,8413	0,1270	0,1550	0,1080	0,1320
5	0,1300	0,1510	16,1538	0,1360	0,1580	0,1160	0,1340
6	0,1220	0,1410	15,5738	0,1170	0,1440	0,1090	0,1250
7	0,1300	0,1500	15,3846	0,1310	0,1530	0,1090	0,1320
8	0,1290	0,1540	19,3798	0,1370	0,1580	0,1170	0,1430
9	0,1370	0,1530	11,6788	0,1400	0,1650	0,1270	0,1390
10	0,1260	0,1490	18,2540	0,1330	0,1590	0,1100	0,1320
Média	0,1293	0,1507	16,65	0,1329	0,1569	0,1141	0,1353
DP	0,005	0,004	3,588	0,007	0,006	0,007	0,006

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	CMO total inicial (g)	CMO total final (g)	Δ% CMO total	CMO total+massa magra final (g)	Massa inicial (g)	Massa final (g)
1	6,50	9,01	38,62	210,70	199,60	260,10
2	6,19	9,17	48,14	207,20	192,60	258,10
3	7,39	9,05	22,46	203,10	214,00	246,10
4	6,46	9,13	41,33	197,70	191,30	251,80
5	7,00	9,73	39,00	227,10	208,60	282,50
6	6,16	8,21	33,28	205,30	205,00	248,90
7	6,70	8,86	32,24	206,10	202,70	250,00
8	6,80	9,20	35,29	216,40	201,80	264,80
9	7,51	9,34	24,37	197,50	217,40	245,40
10	6,43	8,48	31,88	181,50	194,60	240,10
Média	6,71	9,02	34,66	205,26	202,76	254,78
DP	0,47	0,43	7,68	12,12	8,77	12,26

Continuação – Resultados: Densitometria Óssea

GRUPO OVX

Ratas	DMO total inicial (g/cm ²)	DMO total final (g/cm ²)	Δ% DMO total	DMO coluna inicial (g/cm ²)	DMO coluna final (g/cm ²)	DMO m.inf. Inicial (g/cm ²)	DMO m.inf. Final (g/cm ²)
1	0,1406	0,1396	-0,7112	0,1410	0,1420	0,1150	0,1270
2	0,1370	0,1443	5,3285	0,1350	0,1490	0,1190	0,1420
3	0,1392	0,1432	2,8736	0,1320	0,1350	0,1120	0,1380
4	0,1380	0,1452	5,2174	0,1300	0,1410	0,1140	0,1380
5	0,1399	0,1449	3,5740	0,1340	0,1440	0,1280	0,1480
6	0,1470	0,1470	0,0000	0,1370	0,1310	0,1030	0,1270
7	0,1394	0,1427	2,3673	0,1420	0,1340	0,1160	0,1160
8	0,1410	0,1420	0,7092	0,1530	0,1280	0,1240	0,1180
9	0,1410	0,1470	4,2553	0,1490	0,1400	0,1190	0,1200
10	0,1390	0,1380	-0,7194	0,1300	0,1420	0,1140	0,1250
Média	0,1402	0,1447	3,31	0,1383	0,1393	0,1164	0,1212
DP	0,003	0,001	1,108	0,008	0,002	0,007	0,001

GRUPO OVX

Ratas	CMO total inicial (g)	CMO total final (g)	Δ% CMO total	CMO total+massa magra final (g)	Massa inicial (g)	Massa final (g)
1	7,19	9,15	27,24	181,40	214,00	290,00
2	7,12	8,37	17,52	171,70	210,00	289,00
3	6,95	8,66	24,75	179,20	200,00	294,00
4	7,25	8,57	18,24	185,10	212,00	310,00
5	6,88	7,79	13,21	163,50	210,00	258,00
6	9,19	9,19	0,00	172,40	200,00	302,00
7	6,56	7,91	20,63	190,30	205,00	286,00
8	6,97	8,11	16,36	187,00	210,00	251,00
9	6,96	8,83	26,87	237,40	220,00	305,00
10	6,96	8,63	23,99	217,80	217,00	297,00
Média	7,20	8,52	18,88	189,94	209,80	288,20
DP	0,69	0,21	7,71	6,01	6,27	18,34

Continuação – Resultados: Densitometria Óssea

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	DMO total inicial (g/cm ²)	DMO total final (g/cm ²)	Δ% DMO total	DMO coluna inicial (g/cm ²)	DMO coluna final (g/cm ²)	DMO m.inf. Inicial (g/cm ²)	DMO m.inf. Final (g/cm ²)
1	0,1280	0,1430	11,7188	0,1260	0,1350	0,1070	0,1250
2	0,1190	0,1430	20,1681	0,1240	0,1360	0,0980	0,1270
3	0,1240	0,1490	20,1613	0,1250	0,1410	0,1110	0,1350
4	0,1330	0,1530	15,0376	0,1330	0,1460	0,1210	0,1330
5	0,1310	0,1460	11,4504	0,1410	0,1360	0,1230	0,1270
6	0,1280	0,1520	18,7500	0,1340	0,1520	0,1110	0,1240
7	0,1320	0,1470	11,3636	0,1350	0,1400	0,1130	0,1240
8	0,1230	0,1470	19,5122	0,1230	0,1370	0,1110	0,1230
9	0,1260	0,1510	19,8413	0,1300	0,1420	0,1190	0,1330
10	0,1230	0,1400	13,8211	0,1280	0,1400	0,1050	0,1130
11	0,1260	0,1480	17,4603	0,1330	0,1400	0,1140	0,1280
Média	0,1266	0,1472	16,30	0,1302	0,1405	0,1121	0,1265
DP	0,004	0,004	3,697	0,006	0,005	0,007	0,006

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	CMO total inicial (g)	CMO total final (g)	Δ% CMO total	CMO total+massa magra final (g)	Massa inicial (g)	Massa final (g)
1	6,52	9,47	45,25	214,90	204,90	302,70
2	6,07	9,87	62,60	229,00	205,00	306,90
3	6,33	9,11	43,92	219,10	203,00	284,00
4	6,77	9,10	34,42	226,00	208,30	280,80
5	6,88	9,42	36,92	210,70	197,00	277,00
6	6,43	9,77	51,94	217,10	203,40	293,10
7	6,83	9,18	34,41	209,00	209,90	273,90
8	6,36	8,95	40,72	232,80	194,90	276,80
9	6,54	9,69	48,17	234,80	194,80	307,10
10	6,44	9,54	48,14	230,40	203,60	309,20
11	6,35	8,87	39,69	216,40	189,00	276,40
Média	6,50	9,36	44,20	221,84	201,25	289,81
DP	0,24	0,34	8,42	9,09	6,44	14,23

Continuação – Resultados: Densitometria Óssea

GRUPO OVX-EE

Ratas	DMO total inicial (g/cm ²)	DMO total final (g/cm ²)	Δ% DMO total	DMO coluna inicial (g/cm ²)	DMO coluna final (g/cm ²)	DMO m.inf. Inicial (g/cm ²)	DMO m.inf. Final (g/cm ²)
1	0,1432	0,1544	7,8212	0,1410	0,1620	0,1110	0,1350
2	0,1394	0,1463	4,9498	0,1320	0,1490	0,1120	0,1320
3	0,1270	0,1463	15,1969	0,1320	0,1470	0,1170	0,1380
4	0,1305	0,1460	11,8774	0,1340	0,1580	0,1140	0,1320
5	0,1425	0,1577	10,6667	0,1160	0,1430	0,0900	0,1220
6	0,1469	0,1582	7,6923	0,1320	0,1440	0,1160	0,1310
7	0,1390	0,1570	12,9496	0,1350	0,1460	0,1140	0,1300
8	0,1472	0,1512	2,7174	0,1330	0,1470	0,1040	0,1220
9	0,1411	0,1540	9,1425	0,1300	0,1480	0,1060	0,1180
10	0,1401	0,1510	7,7802	0,1350	0,1590	0,1200	0,1340
Média	0,1397	0,1522	9,70	0,1320	0,1502	0,1104	0,1294
DP	0,006	0,002	1,483	0,006	0,003	0,009	0,003

GRUPO OVX-EE

Ratas	CMO total inicial (g)	CMO total final (g)	Δ% CMO total	CMO total+massa magra final (g)	Massa inicial (g)	Massa final (g)
1	8,02	9,41	17,39	235,30	218,00	312,20
2	7,60	9,40	23,70	233,40	220,00	278,30
3	6,93	9,40	35,62	238,70	219,00	337,70
4	7,63	9,44	23,79	239,10	215,00	302,00
5	8,02	10,22	27,57	239,90	220,00	337,60
6	7,97	9,41	17,99	235,50	213,00	296,00
7	7,95	9,54	20,03	236,20	206,00	237,40
8	8,14	9,68	18,96	236,40	218,00	278,40
9	7,32	9,22	25,98	235,70	216,70	309,30
10	7,57	9,50	25,39	237,40	210,00	304,50
Média	7,71	9,55	23,64	237,96	215,57	299,34
DP	0,38	0,11	5,51	4,58	4,64	29,74

Continuação – Resultados: Densitometria Óssea

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	DMO total inicial (g/cm ²)	DMO total final (g/cm ²)	Δ% DMO total	DMO coluna inicial (g/cm ²)	DMO coluna final (g/cm ²)	DMO m.inf. Inicial (g/cm ²)	DMO m.inf. Final (g/cm ²)
1	0,1200	0,1330	10,8333	0,1130	0,1290	0,1080	0,1160
2	0,1360	0,1540	13,2353	0,1300	0,1440	0,1240	0,1350
3	0,1320	0,1500	13,6364	0,1310	0,1460	0,1210	0,1330
4	0,1360	0,1470	8,0882	0,1410	0,1320	0,1190	0,1370
5	0,1240	0,1380	11,2903	0,1320	0,1280	0,1050	0,1120
6	0,1350	0,1550	14,8148	0,1340	0,1480	0,1160	0,1260
7	0,1280	0,1430	11,7188	0,1300	0,1310	0,1070	0,1150
8	0,1270	0,1390	9,4488	0,1250	0,1320	0,1030	0,1110
9	0,1340	0,1530	14,1791	0,1410	0,1390	0,1110	0,1230
10	0,1300	0,1490	14,6154	0,1340	0,1450	0,1100	1,1250
11	0,1370	0,1570	14,5985	0,1420	0,1460	0,1260	0,1340
Média	0,1308	0,1471	12,41	0,1321	0,1382	0,1136	0,2152
DP	0,005	0,008	2,183	0,008	0,007	0,008	0,288

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	CMO total inicial (g)	CMO total final (g)	Δ% CMO total	CMO total+massa magra final (g)	Massa inicial (g)	Massa final (g)
1	6,01	8,92	48,42	201,30	199,40	285,40
2	7,21	9,97	38,28	226,40	222,40	281,80
3	6,54	8,86	35,47	214,20	199,00	265,50
4	6,60	9,30	40,91	180,80	199,40	292,60
5	6,23	8,26	32,58	208,50	198,30	272,70
6	7,06	9,54	35,13	213,20	214,10	273,20
7	6,42	8,53	32,87	215,10	205,90	266,80
8	6,29	8,22	30,68	203,70	198,10	275,70
9	6,74	8,34	23,74	212,60	199,20	283,00
10	6,96	8,66	24,43	211,90	209,80	295,00
11	7,24	9,98	37,85	215,40	209,40	301,00
Média	6,66	8,96	34,58	209,37	205,00	281,15
DP	0,39	0,62	6,74	10,99	7,71	11,09

Anexo 8 – Resultados: Expressão de eNOS e iNOS

GRUPO SHAM

Ratas	eNOS metáfise	eNOS diáfise	iNOS metáfise	iNOS diáfise
1	++	++	++	++
2	++	++	+	++
3	+	++	++	++
4	++	++	++	++
5	++	++	++	+
6	++	+	++	++
7	++	++	++	++
8	++	++	++	++
9	++	++	++	++
10	++	++	++	++
Predomínio	++	++	++	++

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	eNOS metáfise	eNOS diáfise	iNOS metáfise	iNOS diáfise
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
Predomínio	-	-	-	-

GRUPO OVX

Ratas	eNOS metáfise	eNOS diáfise	iNOS metáfise	iNOS diáfise
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
Predomínio	-	-	-	-

Continuação – Resultados: Expressão de eNOS e iNOS

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	eNOS metáfise	eNOS diáfise	iNOS metáfise	iNOS diáfise
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
Predomínio	-	-	-	-

GRUPO OVX-EE

Ratas	eNOS metáfise	eNOS diáfise	iNOS metáfise	iNOS diáfise
1	-	+	-	++
2	+	+	-	+
3	-	+	-	+
4	-	+	-	+
5	-	+	-	+
6	-	+	+	+
7	+	+	-	+
8	-	++	-	+
9	-	+	-	+
10	-	+	-	+
Predomínio	-	+	-	+

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	eNOS metáfise	eNOS diáfise	iNOS metáfise	iNOS diáfise
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
Predomínio	-	-	-	-

Anexo 9 – Resultados: Viabilidade de Osteócitos – Técnica de Caspase

GRUPO SHAM

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	30	75	7	17,5	3	7,5	40	645,2
	2	19	70,4	6	22,2	2	7,4	27	435,5
	3	36	85,7	3	7,1	3	7,1	42	677,4
2	1	36	94,7	2	5,3	0	0,0	38	612,9
	2	31	86,1	3	8,3	2	5,6	36	580,6
	3	28	93,3	0	0,0	2	6,7	30	483,9
3	1	33	80,5	5	12,2	3	7,3	41	661,3
	2	39	84,8	6	13,0	1	2,2	46	741,9
	3	29	93,5	0	0,0	2	6,5	31	500,0
4	1	31	81,6	6	15,8	1	2,6	38	612,9
	2	30	78,9	7	18,4	1	2,6	38	612,9
	3	32	76,2	8	19,0	2	4,8	42	677,4
5	1	26	92,9	0	0,0	2	7,1	28	451,6
	2	26	86,7	1	3,3	3	10,0	30	483,9
	3	25	89,3	0	0,0	3	10,7	28	451,6
6	1	24	82,8	3	10,3	2	6,9	29	467,7
	2	33	97,1	1	2,9	0	0,0	34	548,4
	3	34	85,0	2	5,0	4	10,0	40	645,2
7	1	18	75,0	4	16,7	2	8,3	24	387,1
	2	13	59,1	6	27,3	3	13,6	22	354,8
	3	21	75,0	4	14,3	3	10,7	28	451,6
8	1	18	69,2	6	23,1	2	7,7	26	419,4
9	1	41	87,2	4	8,5	2	4,3	47	758,1
	2	36	70,6	12	23,5	3	5,9	51	822,6
	3	34	89,5	4	10,5	0	0,0	38	612,9
Média		28,9	82,4	4,0	11,4	2,0	6,2	35,0	556,4
DP		7,0	9,4	2,9	8,2	1,0	3,5	7,7	102,4

Continuação – Resultados: Técnica de Caspase

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	27	90,0	2	6,7	1	3,3	30	483,9
	2	40	95,2	0	0,0	2	4,8	42	677,4
	3	40	100,0	0	0,0	0	0,0	40	645,2
2	1	44	100,0	0	0,0	0	0,0	44	709,7
	2	49	100,0	0	0,0	0	0,0	49	790,3
	3	44	91,7	0	0,0	4	8,3	48	774,2
3	1	26	92,9	0	0,0	2	7,1	28	451,6
	2	34	94,4	0	0,0	2	5,6	36	580,6
	3	21	91,3	0	0,0	2	8,7	23	371,0
4	1	34	91,9	0	0,0	3	8,1	37	596,8
	2	35	100,0	0	0,0	0	0,0	35	564,5
	3	38	92,7	0	0,0	3	7,3	41	661,3
5	1	47	85,5	5	9,1	3	5,5	55	887,1
	2	31	100,0	0	0,0	0	0,0	31	500,0
	3	30	93,8	0	0,0	2	6,3	32	516,1
6	1	30	93,8	2	6,3	0	0,0	32	516,1
	2	28	90,3	0	0,0	3	9,7	31	500,0
	3	21	91,3	0	0,0	2	8,7	23	371,0
7	1	26	92,9	0	0,0	2	7,1	28	451,6
	2	49	98,0	0	0,0	1	2,0	50	806,5
	3	35	100,0	0	0,0	0	0,0	35	564,5
Média		34,7	94,4	0,4	0,8	1,5	4,7	36,7	582,9
DP		8,6	2,4	1,2	1,2	1,3	2,2	8,9	111,9

GRUPO OVX

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	6,0	17,6	17,0	50,0	11,0	32,4	34,0	548,4
	2	1,0	3,6	14,0	50,0	13,0	46,4	28,0	451,6
2	1	2,0	11,1	2,0	11,1	14,0	77,8	18,0	290,3
	2	0,0	0,0	3,0	23,1	10,0	76,9	13,0	209,7
3	1	3,0	25,0	1,0	8,3	8,0	66,7	12,0	193,5
	2	5,0	29,4	3,0	17,6	9,0	52,9	17,0	274,2
4	1	2,0	12,5	3,0	18,8	11,0	68,8	16,0	258,1
	2	1,0	7,1	2,0	14,3	11,0	78,6	14,0	225,8
Média		2,5	13,3	5,6	24,2	10,9	62,5	19,0	306,4
DP		2,1	9,5	5,8	15,5	1,8	15,9	7,3	128,9

Continuação – Resultados: Técnica de Caspase

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac total	nro lac/mm2
1	1	52,0	94,5	2,0	3,6	1,0	1,8	55,0	887,1
	2	43,0	82,7	4,0	7,7	5,0	9,6	52,0	838,7
2	1	17,0	65,4	6,0	23,1	3,0	11,5	26,0	419,4
	2	33,0	86,8	4,0	10,5	1,0	2,6	38,0	612,9
	3	29,0	90,6	0,0	0,0	3,0	9,4	32,0	516,1
3	1	48,0	90,6	1,0	1,9	4,0	7,5	53,0	854,8
	2	27,0	93,1	2,0	6,9	0,0	0,0	29,0	467,7
	3	39,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,0	629,0
4	1	43,0	89,6	1,0	2,1	4,0	8,3	48,0	774,2
	2	21,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,0	338,7
	3	43,0	91,5	1,0	2,1	3,0	6,4	47,0	758,1
5	1	26,0	83,9	3,0	9,7	2,0	6,5	31,0	500,0
	2	28,0	96,6	1,0	3,4	0,0	0,0	29,0	467,7
6	1	26,0	96,3	1,0	3,7	0,0	0,0	27,0	435,5
	2	22,0	88,0	1,0	4,0	2,0	8,0	25,0	403,2
	3	30,0	93,8	0,0	0,0	2,0	6,3	32,0	516,1
Média		32,9	90,7	1,7	4,3	1,9	5,1	36,5	605,5
DP		10,4	3,9	1,7	2,7	1,7	1,9	11,1	149,8

Continuação – Resultados: Técnica de Caspase

GRUPO OVX-EE

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	8	66,7	4	33,3	0	0,0	12	193,5
	2	15	75,0	5	25,0	0	0,0	20	322,6
	3	16	69,6	3	13,0	4	17,4	23	371,0
2	1	26	83,9	3	9,7	2	6,5	31	500,0
	2	30	75,0	4	10,0	6	15,0	40	645,2
	3	35	79,5	3	6,8	6	13,6	44	709,7
3	1	25	80,6	3	9,7	3	9,7	31	500,0
	2	27	84,4	3	9,4	2	6,3	32	516,1
	3	28	93,3	1	3,3	1	3,3	30	483,9
4	1	23	85,2	1	3,7	3	11,1	27	435,5
	2	22	75,9	5	17,2	2	6,9	29	467,7
	3	41	93,2	1	2,3	2	4,5	44	709,7
5	1	30	90,9	1	3,0	2	6,1	33	532,3
	2	20	71,4	3	10,7	5	17,9	28	451,6
	3	23	88,5	2	7,7	1	3,8	26	419,4
6	1	27	93,1	2	6,9	0	0,0	29	467,7
	2	41	87,2	4	8,5	2	4,3	47	758,1
	3	27	79,4	2	5,9	5	14,7	34	548,4
7	1	17	89,5	0	0,0	2	10,5	19	306,5
	2	18	100,0	0	0,0	0	0,0	18	290,3
	3	35	94,6	1	2,7	1	2,7	37	596,8
8	1	29	80,6	3	8,3	4	11,1	36	580,6
	2	22	78,6	0	0,0	6	21,4	28	451,6
	3	24	85,7	2	7,1	2	7,1	28	451,6
9	1	21	72,4	4	13,8	4	13,8	29	467,7
	2	26	86,7	2	6,7	2	6,7	30	483,9
	3	21	70,0	6	20,0	3	10,0	30	483,9
10	1	43	95,6	0	0,0	2	4,4	45	725,8
	2	44	91,7	0	0,0	4	8,3	48	774,2
	3	39	97,5	0	0,0	1	2,5	40	645,2
Média		26,8	83,8	2,3	8,2	2,6	8,0	31,6	493,5
DP		8,7	9,0	1,7	7,6	1,8	5,7	8,7	123,4

Continuação – Resultados: Técnica de Caspase

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	41	87,2	6	12,8	0	0,0	47	758,1
	2	38	88,4	3	7,0	2	4,7	43	693,5
	3	27	81,8	2	6,1	4	12,1	33	532,3
2	1	28	87,5	3	9,4	1	3,1	32	516,1
	2	24	88,9	1	3,7	2	7,4	27	435,5
	3	40	88,9	5	11,1	0	0,0	45	725,8
3	1	19	86,4	0	0,0	3	13,6	22	354,8
	2	24	88,9	2	7,4	1	3,7	27	435,5
	3	14	77,8	1	5,6	3	16,7	18	290,3
4	1	35	97,2	0	0,0	1	2,8	36	580,6
	2	60	100,0	0	0,0	0	0,0	60	967,7
	3	26	100,0	0	0,0	0	0,0	26	419,4
5	1	22	84,6	3	11,5	1	3,8	26	419,4
	2	14	77,8	3	16,7	1	5,6	18	290,3
	3	37	97,4	0	0,0	1	2,6	38	612,9
6	1	34	97,1	0	0,0	1	2,9	35	564,5
	2	16	88,9	1	5,6	1	5,6	18	290,3
	3	20	90,9	2	9,1	0	0,0	22	354,8
7	1	10	76,9	0	0,0	3	23,1	13	209,7
	2	17	89,5	1	5,3	1	5,3	19	306,5
	3	33	94,3	1	2,9	1	2,9	35	564,5
8	1	21	100,0	0	0,0	0	0,0	21	338,7
	2	32	94,1	2	5,9	0	0,0	34	548,4
	3	19	82,6	2	8,7	2	8,7	23	371,0
9	1	30	100,0	0	0,0	0	0,0	30	483,9
	2	29	100,0	0	0,0	0	0,0	29	467,7
	3	41	100,0	0	0,0	0	0,0	41	661,3
Média		27,8	90,7	1,4	4,8	1,1	4,5	30,3	492,4
DP		11,0	5,9	1,6	3,2	1,1	4,0	10,8	108,2

Anexo 10 – Resultados: Viabilidade de Osteócitos – Técnica de TUNEL

GRUPO SHAM

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm ²
1	1	35	85,4	4	9,8	2	4,9	41	661,3
	2	31	72,1	12	27,9	0	0,0	43	693,5
	3	30	90,9	0	0,0	3	9,1	33	532,3
2	1	59	93,7	2	3,2	2	3,2	63	1016,1
	2	41	100,0	0	0,0	0	0,0	41	661,3
	3	42	82,4	1	2,0	8	15,7	51	822,6
3	1	31	93,9	0	0,0	2	6,1	33	532,3
	2	43	93,5	2	4,3	1	2,2	46	741,9
	3	28	100,0	0	0,0	0	0,0	28	451,6
4	1	27	96,4	0	0,0	1	3,6	28	451,6
	2	23	100,0	0	0,0	0	0,0	23	371,0
	3	37	92,5	3	7,5	0	0,0	40	645,2
5	1	28	80,0	3	8,6	4	11,4	35	564,5
	2	21	72,4	5	17,2	3	10,3	29	467,7
	3	26	63,4	9	22,0	6	14,6	41	661,3
6	1	28	82,4	2	5,9	4	11,8	34	548,4
	2	17	60,7	7	25,0	4	14,3	28	451,6
	3	29	65,9	10	22,7	5	11,4	44	709,7
7	1	31	96,9	1	3,1	0	0,0	32	516,1
	3	23	85,2	0	0,0	4	14,8	27	435,5
8	1	25	69,4	6	16,7	5	13,9	36	580,6
	2	36	87,8	2	4,9	3	7,3	41	661,3
	3	43	93,5	0	0,0	3	6,5	46	741,9
9	1	28	80,0	3	8,6	4	11,4	35	564,5
	2	31	77,5	6	15,0	3	7,5	40	645,2
	3	38	86,4	3	6,8	3	6,8	44	709,7
Média		32,0	84,7	3,1	8,1	2,7	7,2	37,8	591,4
DP		8,6	11,5	3,3	8,6	2,1	5,3	8,6	123,0

Continuação – Resultados: Técnica de TUNEL

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	40	88,9	2	4,4	3	6,7	45	725,8
	2	59	100,0	0	0,0	0	0,0	59	951,6
	3	32	91,4	1	2,9	2	5,7	35	564,5
2	1	34	100,0	0	0,0	0	0,0	34	548,4
	2	48	96,0	0	0,0	2	4,0	50	806,5
	3	38	92,7	1	2,4	2	4,9	41	661,3
3	1	41	95,3	0	0,0	2	4,7	43	693,5
	2	30	100,0	0	0,0	0	0,0	30	483,9
	3	22	84,6	2	7,7	2	7,7	26	419,4
4	1	42	93,3	2	4,4	1	2,2	45	725,8
	2	34	94,4	0	0,0	2	5,6	36	580,6
	3	30	88,2	0	0,0	4	11,8	34	548,4
5	1	26	72,2	8	22,2	2	5,6	36	580,6
	2	36	87,8	3	7,3	2	4,9	41	661,3
	3	45	97,8	0	0,0	1	2,2	46	741,9
6	1	35	77,8	3	6,7	7	15,6	45	725,8
	2	50	90,9	2	3,6	3	5,5	55	887,1
	3	39	95,1	0	0,0	2	4,9	41	661,3
Média		37,8	91,6	1,3	3,1	2,1	5,3	41,2	648,5
DP		9,0	2,2	2,0	2,2	1,6	1,8	8,4	83,4

GRUPO OVX

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	5	25,0	3	15,0	12	60,0	20	322,6
	2	6	31,6	3	15,8	10	52,6	19	306,5
2	1	9	50,0	3	16,7	6	33,3	18	290,3
	2	11	44,0	4	16,0	10	40,0	25	403,2
3	1	15	62,5	6	25,0	3	12,5	24	387,1
	2	24	64,9	7	18,9	6	16,2	37	596,8
Média		11,7	46,3	4,3	17,9	7,8	35,8	23,8	384,4
DP		6,4	14,7	1,6	3,4	3,1	17,4	6,4	77,0

Continuação – Resultados: Técnica de TUNEL

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	25	80,6	0	0,0	6	19,4	31	500,0
	2	19	86,4	0	0,0	3	13,6	22	354,8
	3	29	90,6	0	0,0	3	9,4	32	516,1
2	1	44	93,6	3	6,4	0	0,0	47	758,1
	2	31	93,9	2	6,1	0	0,0	33	532,3
	3	33	100,0	0	0,0	0	0,0	33	532,3
3	1	44	95,7	1	2,2	1	2,2	46	741,9
	2	60	98,4	1	1,6	0	0,0	61	983,9
	3	64	94,1	1	1,5	3	4,4	68	1096,8
4	1	45	97,8	0	0,0	1	2,2	46	741,9
	2	23	88,5	2	7,7	1	3,8	26	419,4
	3	30	96,8	1	3,2	0	0,0	31	500,0
Média		37,3	93,7	0,9	1,9	1,5	4,3	39,7	645,2
DP		14,3	4,6	1,0	1,5	1,9	6,0	14,1	228,2

Continuação – Resultados: Técnica de TUNEL

GRUPO OVX-EE

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	14	50,0	8	28,6	6	21,4	28	451,6
	2	22	66,7	7	21,2	4	12,1	33	532,3
	3	41	87,2	3	6,4	3	6,4	47	758,1
2	1	16	72,7	5	22,7	1	4,5	22	354,8
	2	26	70,3	8	21,6	3	8,1	37	596,8
	3	51	89,5	5	8,8	1	1,8	57	919,4
3	1	32	94,1	2	5,9	0	0,0	34	548,4
	2	27	87,1	4	12,9	0	0,0	31	500,0
	3	44	97,8	0	0,0	1	2,2	45	725,8
4	1	19	65,5	7	24,1	3	10,3	29	467,7
	2	12	66,7	2	11,1	4	22,2	18	290,3
	3	18	69,2	2	7,7	6	23,1	26	419,4
5	1	17	68,0	5	20,0	3	12,0	25	403,2
	2	13	86,7	0	0,0	2	13,3	15	241,9
	3	23	92,0	0	0,0	2	8,0	25	403,2
6	1	15	71,4	5	23,8	1	4,8	21	338,7
	2	33	76,7	6	14,0	4	9,3	43	693,5
	3	34	77,3	0	0,0	10	22,7	44	709,7
7	1	29	78,4	1	2,7	7	18,9	37	596,8
	2	34	89,5	1	2,6	3	7,9	38	612,9
	3	27	84,4	3	9,4	2	6,3	32	516,1
8	1	25	80,6	3	9,7	3	9,7	31	500,0
	2	49	92,5	2	3,8	2	3,8	53	854,8
	3	33	100,0	0	0,0	0	0,0	33	532,3
9	1	24	55,8	11	25,6	8	18,6	43	693,5
	2	23	88,5	3	11,5	0	0,0	26	419,4
	3	30	73,2	9	22,0	2	4,9	41	661,3
10	1	27	75,0	2	5,6	7	19,4	36	580,6
	2	34	89,5	0	0,0	4	10,5	38	612,9
	3	32	88,9	1	2,8	3	8,3	36	580,6
Média		27,5	79,5	3,5	10,8	3,2	9,7	34,1	514,5
DP		10,0	12,1	3,0	9,1	2,5	7,2	9,8	100,4

Continuação – Resultados: Técnica de TUNEL

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	campos	nro viáveis	% viáveis	nro apoptóticos	% apoptóticos	nro lac. vazias	%lac. vazias	nro lac. total	nro lac/mm2
1	1	34	87,2	4	10,3	1	2,6	39	629,0
	2	21	65,6	8	25,0	3	9,4	32	516,1
	3	28	80,0	5	14,3	2	5,7	35	564,5
2	1	26	78,8	5	15,2	2	6,1	33	532,3
	2	15	65,2	8	34,8	0	0,0	23	371,0
	3	17	65,4	2	7,7	7	26,9	26	419,4
3	1	16	76,2	2	9,5	3	14,3	21	338,7
	2	34	82,9	6	14,6	1	2,4	41	661,3
	3	19	86,4	1	4,5	2	9,1	22	354,8
4	1	28	75,7	5	13,5	4	10,8	37	596,8
	2	45	86,5	3	5,8	4	7,7	52	838,7
	3	18	78,3	5	21,7	0	0,0	23	371,0
5	1	19	82,6	3	13,0	1	4,3	23	371,0
	2	15	65,2	3	13,0	5	21,7	23	371,0
	3	19	100,0	0	0,0	0	0,0	19	306,5
6	1	33	84,6	3	7,7	3	7,7	39	629,0
	2	33	100,0	0	0,0	0	0,0	33	532,3
	3	23	95,8	1	4,2	0	0,0	24	387,1
7	1	27	87,1	3	9,7	1	3,2	31	500,0
	2	32	91,4	3	8,6	0	0,0	35	564,5
	3	27	87,1	0	0,0	4	12,9	31	500,0
8	1	28	75,7	9	24,3	0	0,0	37	596,8
	2	33	73,3	12	26,7	0	0,0	45	725,8
	3	25	80,6	6	19,4	0	0,0	31	500,0
9	1	26	78,8	5	15,2	2	6,1	33	532,3
	2	48	85,7	5	8,9	3	5,4	56	903,2
	3	35	87,5	2	5,0	3	7,5	40	645,2
Média		26,8	82,6	4,0	11,2	1,9	6,2	32,7	508,5
DP		8,6	7,1	2,9	6,3	1,9	4,2	9,3	100,9

Anexo 11 - Resultados: Histomorfometria Óssea

1) Parâmetros de Remodelamento Ósseo

GRUPO SHAM

Ratas	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (um/d)	BFR/BS
1	0,47	10,5700	1,3886	5,8368	2,7783			
2	0,40	4,0480	0,3195	3,0260	1,9208			
3	0,12	2,8183	0,9649	1,0789	0,7753			
4	0,89	8,5781	0,8208	2,1288	1,1190			
5	0,25	4,4143	1,7577	2,6081	1,3341	8,8377	2,0101	0,18
6	0,30	3,8076	0,9600	3,3373	2,1447	4,3601	1,4341	0,06
7	0,29	6,1619	1,1692	2,6193	1,5087	8,2208	1,7208	0,14
8	0,92	12,3441	2,2178	2,3103	1,2833	12,5305	2,1124	0,26
9	0,59	9,8593	1,7753	6,8809	3,2941	5,3922	1,3617	0,07
10	4,13		1,8078	2,7241	1,5231	6,8666	2,6720	0,18
Média	0,86	6,96	1,32	3,26	1,77	7,70	1,89	0,15
DP	1,08	3,46	0,58	1,76	0,78	2,90	0,49	0,08

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (um/d)	BFR/BS
1	0,0392	0,7530	0,3839	2,6370	1,7597	6,1354	1,3716	0,08
2	0,1051	1,3719	1,0569	5,6652	3,5891	0,3791	0,7789	0,00
3	0,0000	0,0000	0,8445	1,7008	0,9644	6,9509	1,3930	0,10
4	0,0377	0,5893	0,7223	3,1150	1,7906	3,6076	0,8776	0,03
5	0,0508	0,7548	1,6706	7,0229	4,4445	2,8421	0,5950	0,02
6	0,0783	1,3966	1,5571	5,5312	3,2901	3,5951	0,9211	0,03
7	0,0014	0,2111	0,3450	2,8401	1,7561	3,0313	0,6305	0,02
8	0,0358	0,4455	0,2525	4,6205	2,7758	3,9264	0,9648	0,04
Média	0,04	0,69	0,85	4,14	2,55	3,81	0,94	0,04
DP	0,04	0,50	0,54	1,84	1,17	2,02	0,30	0,03

GRUPO OVX

Ratas	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (um/d)	BFR/BS
1	0,0000	0,0000	0,4865	2,5279	1,4035	14,3944	3,6156	0,52
2	0,0130	1,4499	0,3546	3,6075	1,9475	10,3726	1,9319	0,20
3	0,0000	0,0000	0,0000	5,4730	2,9885	17,0038	2,2959	0,39
4	0,0000	0,0000	0,4049	3,2142	1,7496	24,5697	2,4407	0,60
5	0,0000	0,0000	1,0926	4,4075	3,5256	8,5228	1,5221	0,13
6	0,7816	14,2130	1,7365	7,8796	5,5089	4,2101	0,4524	0,02
7	0,7244	11,8389	0,6908	5,3552	3,0922	24,8869	5,2636	1,31
8	1,9372	13,6763	0,0000	5,1400	3,2322	23,4044	2,4651	0,58
Média	0,43	5,15	0,60	4,70	2,93	15,92	2,50	0,47
DP	0,70	6,75	0,58	1,67	1,30	7,90	1,43	0,40

Continuação - Resultados: Parâmetros de Remodelamento Ósseo

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (um/d)	BFR/BS
1	0,1491	3,9922	0,5915	9,9632	5,8070	12,1465	1,3691	0,17
2	0,1677	1,6729	0,8629	5,9532	3,7546	2,3839	1,0523	0,03
3	0,9330	19,0953	1,4628	6,3888	3,8382	7,9193	1,0297	0,08
4	0,1368	1,9246	0,7456	7,8300	5,5090	9,9891	0,6156	0,06
5	0,5033	6,6520	0,7916	5,9568	3,3674	4,8653	1,0440	0,05
6	0,1891	2,6841	0,6150	5,4450	3,5435	2,3344	0,2882	0,01
7	0,0000	0,0000	0,6322	1,6785	1,0197	2,9553	1,6902	0,05
8	0,0000	0,0000	0,9058	6,7554	4,6626	4,1575	0,8859	0,04
Média	0,26	4,50	0,83	6,25	3,94	5,84	1,00	0,06
DP	0,31	6,28	0,28	2,34	1,49	3,73	0,43	0,05

GRUPO OVX-EE

Ratas	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (um/d)	BFR/BS
1	0,9771	9,7793	1,4702	1,0248	0,8296	2,7068	1,2918	0,03
2	1,4762	13,9311	1,9205	1,9382	1,5872	5,5844	2,5520	0,14
3	0,2844	4,7130	0,8457	1,2151	0,9208	2,0405	0,7836	0,02
4	0,1939	5,2614	1,7772	4,9325	3,0242	1,6649	0,3935	0,01
5	1,6126	12,2744	0,0000	4,3049	3,6710	10,9897	2,1983	0,24
6	0,1863	4,5939	0,0000	4,1360	2,7961	2,4993	0,2287	0,01
7	0,5306	5,8904	0,9596	4,8523	2,6380	15,1569	1,6286	0,25
8	0,1814	2,3758	0,0000	0,2851	0,6609	8,4158	1,1938	0,10
9	0,4635	5,9751	0,7340	7,2999	4,1342	20,1120	1,5650	0,31
Média	0,66	7,20	0,86	3,33	2,25	7,69	1,32	0,12
DP	0,56	3,89	0,76	2,32	1,29	6,58	0,77	0,12

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (um/d)	BFR/BS
1	0,5737	7,5052	1,9514	4,2279	3,2799	17,5939	1,5685	0,28
2	0,0745	1,0274	0,3904	1,9909	1,7511	10,4197	0,9933	0,10
3	0,2092	4,3112	0,6186	3,8560	2,5749	12,5160	2,3919	0,30
4	0,0000	0,0000	1,5441	1,4612	0,8127	12,0752	0,9825	0,12
5	0,0000	0,0000	0,3312	1,5439	0,8335	8,0547	1,9910	0,16
6	0,1396	3,6774	1,3481	1,2218	0,7042	8,0808	1,5336	0,12
7	0,1116	2,5301	1,2641	4,2827	2,5870	16,1488	2,2025	0,36
Média	0,16	2,72	1,06	2,65	1,79	12,13	1,67	0,21
DP	0,20	2,71	0,62	1,40	1,04	3,70	0,56	0,10

Continuação - Resultados: Histomorfometria Óssea

2) Parâmetros de Estrutura, Microarquitetura e Conectividade Óssea

GRUPO SHAM

Ratas	BV/TV (%)	TbTh (µm)	Tb N	Tb Sp (µm)	Nd.N/TV (/mm ²)
1	19,53	56,37	3,46	232,28	3,88
2	10,01	52,31	1,91	470,05	4,26
3	17,15	50,35	3,41	243,23	7,37
4	24,45	59,46	4,11	183,74	8,66
5	24,27	64,43	3,77	201,00	9,84
6	21,26	59,78	3,56	221,39	6,99
7	24,56	59,38	4,14	182,38	7,05
8	35,20	73,51	4,79	135,33	16,88
9	37,30	77,24	4,83	129,85	18,40
10	34,72	64,32	5,40	120,93	12,61
Média	24,85	61,71	3,94	212,02	9,59
DP	8,25	8,09	0,92	95,28	4,69

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	BV/TV (%)	TbTh (µm)	Tb N	Tb Sp (µm)	Nd.N/TV (/mm ²)
1	30,75	57,04	5,39	128,45	17,06
2	48,35	99,49	4,86	106,28	15,28
3	37,94	71,87	5,28	117,54	17,59
4	44,84	69,35	6,47	85,30	24,81
5	35,10	56,11	6,26	103,74	18,69
6	27,94	47,49	5,88	122,48	20,79
7	30,49	52,89	5,76	120,61	15,38
8	41,19	62,76	6,56	89,62	23,21
Média	37,08	64,62	5,81	109,25	19,10
DP	7,33	16,28	0,61	15,76	3,53

GRUPO OVX

Ratas	BV/TV (%)	TbTh (µm)	Tb N	Tb Sp (µm)	Nd.N/TV (/mm ²)
1	8,48	60,91	1,39	657,32	
2	7,01	52,70	1,33	698,64	2,26
3	9,08	54,60	1,66	546,45	3,31
4	9,70	57,92	1,68	538,98	3,47
5	11,68	69,97	1,67	529,06	4,70
6	7,76	46,56	1,67	553,75	2,13
7	13,03	63,77	2,04	425,63	4,31
8	10,29	54,21	1,90	472,42	3,44
9	14,50	67,59	2,15	398,52	5,58
Média	10,17	58,69	1,72	535,64	3,65
DP	2,48	7,56	0,27	97,96	1,18

Continuação - Resultados: Parâmetros de Estrutura, Microarquitetura e Conectividade Óssea

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	BV/TV (%)	TbTh (μm)	Tb N	Tb Sp (μm)	Nd.N/TV (/mm ²)
1	21,82	65,61	3,33	235,03	6,29
2	8,11	49,05	1,65	555,57	1,94
3	13,07	57,01	2,29	379,12	3,82
4	20,26	69,32	2,92	272,92	6,06
5	7,44	51,53	1,44	640,94	1,68
6	4,72	51,34	0,92	1035,56	0,82
7	23,21	62,36	3,72	206,27	4,08
Média	14,09	58,03	2,33	475,06	3,53
DP	7,64	7,88	1,04	296,67	2,15

GRUPO OVX-EE

Ratas	BV/TV (%)	TbTh (μm)	Tb N	Tb Sp (μm)	Nd.N/TV (/mm ²)
1	15,50	57,50	2,70	313,44	7,11
2	18,84	56,51	3,33	243,39	7,49
3	15,23	56,98	2,67	317,16	7,81
4	17,89	62,78	2,85	288,11	4,89
5	10,22	69,15	1,48	607,62	2,74
6	7,44	57,94	1,28	721,15	1,18
7	44,84	69,35	6,47	85,30	2,03
8	35,10	56,11	6,26	103,74	2,13
9	27,94	47,49	5,88	122,48	3,94
10	26,67	66,43	4,01	182,64	3,38
Média	21,97	60,02	3,69	298,50	4,27
DP	11,03	6,51	1,81	201,42	2,32

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	BV/TV (%)	TbTh (μm)	Tb N	Tb Sp (μm)	Nd.N/TV (/mm ²)
1	17,26	62,46	2,76	299,51	5,87
2	37,34	72,55	5,15	121,75	24,88
3	17,41	70,78	2,46	335,86	5,46
4	6,46	58,99	1,10	853,96	1,95
5	11,76	65,81	1,79	493,95	1,74
6	13,44	56,24	2,39	362,08	7,90
7	7,07	52,24	1,35	686,35	1,78
8	15,75	70,03	2,25	374,49	5,22
Média	15,81	63,64	2,41	441,00	6,85
DP	9,67	7,40	1,25	232,13	7,63

Anexo 12 – Parâmetros Hemodinâmicos

GRUPO SHAM

Ratas	DC	VS	PAS	PAD	PAM	FC
1	94,5	234,8	139,6	113,4	127,0	402,6
2	71,5	177,6	151,6	74,2	96,4	402,6
3	79,3	164,8	136,6	102,4	118,0	481,8
4	81,0	188,7	101,8	77,4	91,6	429,8
5	96,0	228,0	122,4	109,0	117,2	421,4
6	94,1	222,7	121,6	82,3	96,6	422,6
7	96,4	208,5	117,7	96,0	108,0	462,6
Média	87,6	203,6	127,3	93,5	107,8	431,9
DP	10,1	27,0	16,5	15,7	13,4	29,9

GRUPO SHAM-L-NAME

Ratas	DC	VS	PAS	PAD	PAM	FC
1	61,8	146,4	199,7	155,3	170,0	422,3
2	62,7	146,8	171,0	115,7	139,3	427,0
3	66,3	154,6	157,7	123,7	135,0	431,0
4	71,3	171,3	177,3	127,0	152,0	423,3
5	54,3	131,5	203,0	147,0	168,0	413,0
6	58,9	160,7	170,3	130,7	147,0	366,0
7	90,9	220,1	171,3	143,7	158,7	413,3
8	63,6	162,5	209,0	163,0	182,0	392,3
Média	66,2	161,7	182,4	138,2	156,5	411,0
DP	11,2	26,5	18,8	16,6	16,2	21,8

GRUPO OVX

Ratas	DC	VS	PAS	PAD	PAM	FC
1	120,0	293,0	128,0	114,0	122,0	410,0
2	114,0	265,0	140,0	82,0	110,0	430,0
3	111,0	281,0	156,0	102,0	129,0	388,0
4	108,7	335,1	121,4	114,6	118,0	401,0
5	114,0	262,5	127,2	123,0	125,4	436,2
6	117,4	279,6	119,0	97,0	109,3	420,0
7	122,4	258,0	119,0	100,0	109,3	474,3
8	109,3	273,2	120,7	116,7	119,0	418,7
9	116,2	287,1	117,7	106,7	110,3	397,0
Média	114,8	281,6	127,7	106,2	116,9	419,5
DP	4,7	23,2	12,7	12,5	7,6	25,8

GRUPO OVX-L-NAME

Ratas	DC	VS	PAS	PAD	PAM	FC
1	71,2	182,0	195,7	173,3	185,7	393,0
2	64,9	136,5	208,0	174,0	191,3	474,3
3	62,7	155,1	202,3	177,7	189,7	404,3
4	68,0	152,0	200,0	172,3	187,0	450,0
Média	66,7	156,4	201,5	174,3	188,4	430,4
DP	3,7	18,9	5,1	2,3	2,6	38,3

DC = Débito Cardíaco, VS = Volume Sistólico, PAS = Pressão Arterial Sistólica, PAD = Pressão Arterial Diastólica, PAM = Pressão Arterial Média, FC = Frequência Cardíaca

Continuação - Parâmetros Hemodinâmicos

GRUPO OVX-EE

Ratas	DC	VS	PAS	PAD	PAM	FC
1	121,5	250,3	125,7	90,7	107,3	486,0
2	118,9	244,9	137,3	117,0	123,7	485,7
3	118,1	243,0	145,0	107,3	120,0	486,0
4	117,3	346,3	136,2	78,6	103,8	338,8
5	129,0	313,1	126,0	117,0	120,0	412,0
6	114,9	298,5	124,3	121,3	123,0	385,7
7	73,3	217,7	123,3	113,8	118,5	379,8
8	100,4	219,6	102,8	94,3	99,0	457,5
Média	111,7	266,7	127,6	105,0	114,4	428,9
DP	17,5	47,0	12,7	15,4	9,6	57,6

GRUPO OVX-EE-L-NAME

Ratas	DC	VS	PAS	PAD	PAM	FC
1	80,6	205,1	206,0	125,7	160,3	395,3
2	73,6	198,6	212,0	136,0	171,0	375,0
3	95,5	234,7	168,5	94,5	124,3	406,8
4	91,7	174,6	167,0	120,7	140,7	526,0
5	106,1	201,8	131,3	121,0	128,7	526,0
Média	89,5	203,0	177,0	119,6	145,0	445,8
DP	12,8	21,4	32,9	15,3	20,2	74,1

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)