

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS (PPGSPAT) – MESTRADO
TRAYSE GRANELI SOARES

INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E
NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*)

UBERABA - MG

2021

TRAYSE GRANELI SOARES

**INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E
NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (UNIUBE) como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

**Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini
Leonel Alves**

**Coorientadora: Profa. Dra. Isabel
Rodrigues Rosado**

UBERABA - MG

2021

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

- S11i Soares, Trayse Graneli.
Influência do undecilato de testosterona na massa corporal e na reparação óssea de ratos (*Rattus norvegicus*) / Trayse Graneli Soares. – Uberaba, 2021.
127 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.
Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.
Coorientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado.
1. Esteroides. 2. Ratos. 3. Ossos – Regeneração. 4. Ortopedia veterinária. I. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. II. Rosado, Isabel Rodrigues. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 572.579

TRAYSE GRANELI SOARES

INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA
REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Sanidade e
Produção Animal nos Trópicos do Programa de
Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal
nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção
Animal nos Trópicos

Aprovada em: 29/10/2021

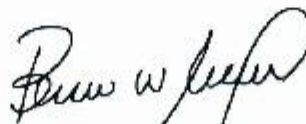
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves - Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto
FCAV/Unesp

“Não seria maravilhoso o mundo se as bibliotecas fossem mais importantes que os bancos? ”
– Mafalda

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francelina Graneli Soares e Edilson Soares, por todo o suporte, oportunidades e incentivo durante toda minha formação.

A minha irmã Jênifer Graneli Soares pela motivação diária.

Ao meu amigo e namorado, Lucas Cataldi, por todos os dias me dizer “você é capaz” e me ajudar a seguir em frente.

Aos meus animais, Mel e Nina e todos aqueles que já participaram de minha vida, por serem os principais responsáveis pelo meu amor à profissão.

Ao Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves, meu orientador, por acreditar na minha capacidade, ser um grande incentivador e por toda sua dedicação para com este projeto, sempre disposto a buscar soluções para os problemas que cruzaram nosso caminho.

A Prof^ª. Dra. Isabel Rodrigues Rosado, coorientadora, por todo o suporte e disponibilidade em ajudar.

Aos professores da pós-graduação, André Belico de Vasconcelos, Ian Martin, Mauricio Scoton Igarasi e Renato Linhares Sampaio, que destinaram um tempo para compartilhar conhecimento.

Aos professores Bruno Watanabe Minto, Endrigo Gabellini Leonel Alves e Renato Linhares Sampaio por aceitarem participar da banca de qualificação desta dissertação, e aos professores Bruno Machado Bertassoli e Ian Martin, por se disporem a ser avaliadores suplentes caso se faça necessário.

Às amigas de mestrado, Denise Reis, Julia Perinotto Picelli, Juliana Gonzaga da Silva, Marina Cazarini Madeira e Nathali Adrielli Agassi de Sales, que me acompanharam nessa trajetória, por compartilharem cada minuto dessa experiência comigo, sendo meu suporte e ombro amigo. E aos demais colegas de turma, que alegraram os dias e dividiram experiências.

Aos amigos de longa data, por toda paciência com minha ausência.

A todos técnicos de laboratório, sempre solícitos e gentis, Camilla Beatriz da Silva, Andrea Cristina Costa, Luiz Fernando Vaz e Marcelo Silveira Hermeto, agradeço por todo ensinamento, paciência e pela amizade construída nessa jornada.

Aos alunos de Iniciação Científica Franciele Neuza Bizinoto, Henrique Mendonça Imada, Júlia Ciabotti Sedassari Galvão, Mariana Almeida Ferreira, Michelle Lucas Faria, Paola Stephanie Queiroz do Amaral, Pedro Henrique Cardoso Fideles e Vitória Gabriela Silva Souza

Por contribuírem ativamente com o projeto de pesquisa e desempenharem as tarefas atribuídas à vocês de forma exemplar.

Às secretárias do programa de mestrado, Lanamara Batista Gomes e Flávia Michele da Silva, por sempre estarem presentes, pela cooperação e o convívio diário.

À Universidade de Uberaba, cuja os recursos financeiros e a infraestrutura permitiram a execução deste projeto.

À CAPES – PROSUP pela concessão da bolsa de estudos.

E, por fim, agradeço imensamente e deixo aqui todo o meu respeito a todos os animais utilizados neste experimento.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi desenvolvido com recursos financeiros da Universidade de Uberaba (Uniube) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A testosterona é um hormônio esteroide que exerce grande influência no metabolismo ósseo e na massa corporal. Quando aplicada em doses suprafisiológicas, ela é capaz de gerar aumento de massa magra e massa muscular, e ainda pode levar à uma redução de massa corporal, circunferência abdominal e gordura visceral. O hormônio testosterona, exerce ainda ação no tecido ósseo, influenciando na formação e reabsorção óssea. O undecilato de testosterona é um dos principais análogos sintéticos da testosterona, realizando as mesmas ações no organismo que a testosterona, sendo por isso um dos principais fármacos de eleição. Dessa forma, esse estudo buscou realizar uma revisão de literatura narrativa acerca da ação da testosterona no metabolismo ósseo e massa corporal, e ainda, avaliar a influência do undecilato de testosterona, na massa corporal e no processo de reparação óssea de tíbias de ratos não obesos e obesos submetidos à ostectomia monocortical. Os animais do experimento foram divididos em três grupos de animais obesos e não obesos, sendo os os grupos: placebo, undecilato e controle. Os animais dos grupos placebo e undecilato foram submetidos à ostectomia óssea monocortical em suas tíbias e receberam aplicações semanais de placebo ou undecilato enquanto os animais do grupo controle não foram submetidos à ostectomia e não foi realizada a aplicação de nenhum tratamento. Os animais do grupo placebo e undecilato foram avaliados aos três dias, sete, 19 e aos 28 dias após lesão, enquanto os animais do grupo controle foram avaliados no dia sete. Para monitoração da massa corporal foram avaliados o índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal, massa das gorduras viscerais e índice de adiposidade (IA). Para avaliação da reparação óssea foram avaliados os dados de massas ósseas total, orgânica e mineral, força máxima, deformação até falha, módulo de elasticidade, avaliação histológica e área de tecido ósseo. Os resultados de uma forma geral, permitiram concluir que a ação da testosterona e de seu análogo undecilato de testosterona, na massa corporal e no metabolismo ósseo é dose dependente e que sua atividade no tecido adiposo e ósseo pode estar sujeita a interferência de alguns fatores, como por exemplo, a obesidade.

Palavras-chave: Esteróide, rato, regeneração óssea, ortopedia, gordura.

ABSTRACT

Testosterone is a steroid hormone that exerts a great influence on bone metabolism and body mass. Testosterone, when applied in supraphysiological doses, is capable of increasing lean and muscle mass and reducing body mass, waist circumference and visceral fat. The hormone testosterone also exerts action on bone tissue, influencing bone formation and resorption. Testosterone undecylate is one of the main synthetic analogues of testosterone, which performs the same actions in the body as testosterone, making it one of the main drugs of choice. Thus, this study sought to carry out a review of the narrative literature about the action of testosterone on bone metabolism and body mass, and also to evaluate the influence of testosterone undecylate on body mass and on the bone repair process of the tibiae of non-obese rats. and obese patients undergoing monocortical ostectomy. The experimental animals were divided into three groups of obese and non-obese animals, the groups being: placebo, undecylate and control. The animals in the placebo and undecylate groups underwent monocortical bone ostectomy in their tibias and received weekly applications of placebo or undecylate while the animals in the control group were not submitted to ostectomy and no treatment was applied. The animals in the placebo and undecylate groups were evaluated at three, seven, 19 and 28 days after injury, while the animals in the control group were evaluated on day seven. In both studies, body mass index (BMI), waist circumference, visceral fat mass and adiposity index (AI) were evaluated to monitor body mass. To assess bone repair, data on total, organic and mineral bone mass, ultimate strength, ultimate displacement, modulus of elasticity, histological evaluation and bone tissue area were evaluated. The results of both studies, in general, showed that testosterone undecylate was not able to promote the reduction of visceral fat and adiposity index, as described in chapter 1. Regarding bone metabolism, testosterone undecylate promoted an anabolic effect, acting mainly on soft tissue, increasing the mass of soft tissue in bone as an organ, without increasing the amount of newly formed bone in bone lesions. The studies allowed us to conclude that the action of testosterone and its analogue testosterone undecylate on body mass and bone metabolism is dose dependent and that its activity in adipose tissue and bone may be subject to the interference of some factors, such as, for example, obesity.

Keywords: Steroid, rats, bone regeneration, orthopaedics, fat.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 – INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*) NÃO OBESOS

- Figura 1.** Representação esquemática dos grupos experimentais empregados no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Grupo placebo: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) com posterior aplicação de placebo; Grupo undecilato: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) com posterior aplicação de undecilato de testosterona; e Controle: não realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) e sem aplicação de tratamento. **49**
- Figura 2.** Indução do defeito ósseo monocortical em tíbia de rato Wistar não obeso empregado no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Realizada uma incisão de pele craniomedial à região proximal de tíbia, de aproximadamente 1,5 cm, divulsão do tecido subcutâneo e exposição do periósteo (A). Defeito ósseo induzido com o auxílio de uma broca de 2 mm de diâmetro acoplada à uma furadeira ortopédica autoclavável (B). Lavagem do defeito ósseo com solução de Cloreto de Sódio 0,9% para remoção de resquícios ósseos (C e D). Abolição do espaço morto do subcutâneo em padrão simples contínuo, seguido por uma sutura subcuticular para aproximação de pele com nailon 4-0 (E). **51**
- Figura 3.** Realização do teste de flexão em três pontos em tíbia de rato Wistar não obeso para determinação de força máxima de compressão, módulo de elasticidade e deformação máxima da tíbia. Observar o posicionamento do osso com a lesão voltada para baixo. **54**

- Figura 4.** Médias e desvios padrão da circunferência abdominal dos ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado (pré x tratamento) não pareado (placebo x undecilato) ($p < 0,05$). 58
- Figura 5.** Médias e desvios padrão da massa corporal dos ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado (pré x tratamento) não pareado (placebo x undecilato) ($p < 0,05$). 59
- Figura 6.** Médias e desvios padrão do Índice de massa corporal (IMC) dos ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado (pré x tratamento) e não pareado (placebo x undecilato) ($p < 0,05$). 61
- Figura 7.** Médias e desvios padrão da massa do tecido adiposo visceral entre ratos não obesos submetidos à lesão óssea, tratados com placebo ou com undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 62
- Figura 8.** Médias e desvios padrão do Índice de adiposidade entre ratos não obesos submetidos à lesão óssea, tratados com placebo ou com undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 63
- Figura 9.** Médias e desvios padrão das massas osséas totais de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 64
- Figura 10.** Médias e desvios padrão das massas ósseas orgânicas de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 65

- Figura 11.** Médias e desvios padrão da massa óssea mineral de tíbias de ratos não obesos 66
controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo
ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo
teste T não pareado ($p < 0,05$).
- Figura 12.** Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos não obesos 67
submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à
ostectomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou
undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo
teste T não pareado ($p < 0,05$).
- Figura 13.** Média e desvio padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos não obesos 68
submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à
ostectomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou
undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo
teste T não pareado ($p < 0,05$).
- Figura 14.** Médias e desvios padrão do módulo de elasticidade de tíbias de ratos não obesos 69
submetidos ao teste de flexão em três pontos, dos animais controle ou submetidos
à ostectomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou
undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo
teste T não pareado ($p < 0,05$).
- Figura 15.** Micrografia do osso neoformado em defeitos ósseos em tíbias de ratos não obesos, 70
tratados com placebo ou undecilato e testosterona aos três, sete 19 e 28 dias após a
lesão. Observar que a reparação óssea ocorreu por primeira intesão, que o osso
neoformado aos sete dias é esponjoso e que o processo de remodelação se encontra
avançado aos 28 dias. Hematoxilina eosina. Aumento de 20 x, Barra = 200 μ m.
- Figura 16.** Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias integras (controle) ou 71
submetidas a ostectomia monocortical de ratos tratamento com placebo ou
undecilato de testosterona, avaliação realizada aos três, sete, 19 e 28 dias após a
lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Capítulo 3 – INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*) OBESOS

- Figura 1.** Representação esquemática dos grupos experimentais obesos empregados no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Grupo placebo: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) com posterior aplicação de placebo; Grupo undecilato: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) com posterior aplicação de undecilato de testosterona; e Controle: não realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) e sem aplicação de tratamento. **87**
- Figura 2.** Indução do defeito ósseo monocortical em tíbia de rato Wistar obeso empregado no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Realizada uma incisão de pele craniomedial à região proximal de tíbia, de aproximadamente 1,5 cm, divulsão do tecido subcutâneo e exposição do periósteo (A). Defeito ósseo induzido com o auxílio de uma broca de 2 mm de diâmetro acoplada à uma furadeira ortopédica autoclavável (B). Lavagem do defeito ósseo com solução de Cloreto de Sódio 0,9% para remoção de resquícios ósseos (C e D). Abolição do espaço morto do subcutâneo em padrão simples contínuo, seguido por uma sutura subcuticular para aproximação de pele com náilon 4-0 (E). **91**
- Figura 3.** Realização do teste de flexão em três pontos em tíbia de rato Wistar obeso para determinação de força máxima de compressão, módulo de elasticidade e deformação máxima da tíbia. Observar o posicionamento do osso com a lesão voltada para baixo. **94**

- Figura 4.** Médias e desvios padrão das circunferências abdominais de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado ($p<0,05$). 98
- Figura 5.** Médias e desvios padrão das massas corporais de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado ($p<0,05$). 99
- Figura 6.** Médias e desvios padrão do índice de massa corporal (IMC) dos ratos obesos antes da lesão e após serem submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T pareado ($p<0,05$). 100
- Figura 7.** Médias e desvios padrão da massa do tecido adiposo visceral de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). 101
- Figura 8.** Médias e desvios padrão do índice de adiposidade de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). 102
- Figura 9.** Médias e desvios padrão da massa óssea total dos ratos obesos do grupo controle óssea e após serem submetidos à ostectomia proximal de tíbia, tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. 103
- Figura 10.** Médias e desvios padrão da massa óssea orgânica de ratos obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). 104

- Figura 11.** Médias e desvios padrão da massa óssea mineral de ratos obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 105
- Figura 12.** Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 106
- Figura 13.** Médias e desvios padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical de tíbia proximal tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 107
- Figura 14.** Médias e desvios padrão do módulo de elasticidade de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical de tíbia proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$) 108
- Figura 15.** Micrografia do osso neoformado em defeitos ósseos em tíbias de ratos obesos, tratados com placebo ou undecilato e testosterona aos três, sete 19 e 28 dias após a lesão. Observar que a reparação óssea ocorreu por primeira intesão, que o osso neoformado aos sete dias é esponjoso e que o processo de remodelação se encontra avançado aos 28 dias. Hematoxilina eosina. Aumento de 200 x. Barra = 200µm 109
- Figura 16.** Área de tecido ósseo de tíbias de ratos obesos submetidas ou não a ostectomia monocortical e tratados com placebo ou undecilato de testosterona, avaliações realizadas aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). 110

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*) NÃO OBESOS

Tabela 1.	Médias e desvios padrão das circunferências abdominais de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	58
Tabela 2.	Médias e desvios padrão das massas corporais de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	58
Tabela 3.	Médias e desvios padrão dos Índices de Massas Corporais (IMC) de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	60
Tabela 4.	Médias e desvios padrão do tecido adiposo visceral de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	61
Tabela 5.	Médias e desvios padrão dos Índices de Adiposidade de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	62
Tabela 6.	Médias e desvios padrão das massas ósseas totais de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias.	63

Tabela 7.	Médias e desvios padrão das massas ósseas orgânicas de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias.	64
Tabela 8.	Médias e desvios padrão da massa óssea mineral de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias.	65
Tabela 9.	Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à ostectomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	66
Tabela 10.	Média e desvio padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à ostectomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	67
Tabela 11.	Média e desvio padrão do módulo elasticidade (N/mm) de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à ostectomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	68
Tabela 12.	Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias integras (controle) ou submetidas a ostectomia monocortical de ratos tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliação realizada aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	71

Capítulo 3 – INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*) OBESOS

Tabela 1.	Relação de porcentagem dos ingredientes destinados à preparação da dieta hipercalórica utilizada para indução de obesidade em ratos Wistar submetidos à ostectomia monocortical em tíbias.	89
Tabela 2.	Médias e desvios padrão das circunferências abdominais de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	97
Tabela 3.	Médias e desvios padrão da massa corporal de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	98
Tabela 4.	Médias e desvios padrão do índice de massa corporal (IMC) de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	100
Tabela 5.	Médias e desvios padrão da massa do tecido adiposo visceral de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	101
Tabela 6.	Médias e desvios padrão do índice de adiposidade de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	102

Tabela 7.	Médias e desvios padrão da massa óssea total de tíbias de ratos normais e obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	103
Tabela 8.	Médias e desvios padrão da massa óssea orgânica de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	104
Tabela 9.	Médias e desvios padrão da massa óssea orgânica de ratos obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	105
Tabela 10.	Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	106
Tabela 11.	Média e desvio padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos do grupo controle e após ostectomia monocortical de tíbia proximal tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão.	107
Tabela 12.	Média e desvio padrão do módulo de elasticidade de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical de tíbia proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	108
Tabela 13.	Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias de ratos obesos submetidas ou não a ostectomia monocortical e tratadas com placebo ou undecilato de testosterona, avaliações realizada aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.	110

LISTA DE ANEXOS

Capítulo 2 – INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*) NÃO OBESOS

Anexo 1.	Comitê de Ética em Experimentação animal	123
Anexo 2.	Formalina tamponada a 10% - 5 Litros	124
Anexo 3.	Protocolo de preparo de EDTA 10% (pH 7,4) – 1 litro (para descalcificação óssea)	125
Anexo 4.	Protocolo de preparo de PBS 1,5 molar e 0,15 molar – 1 litro	126

Capítulo 3 – INFLUÊNCIA DO UNDECILATO DE TESTOSTERONA NA MASSA CORPORAL E NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATOS (*Rattus norvegicus*) OBESOS

Anexo 1.	Comitê de Ética em Experimentação animal	124
Anexo 2.	Formalina tamponada a 10% - 5 Litros	125
Anexo 3.	Protocolo de preparo de EDTA 10% (pH 7,4) – 1 litro (para descalcificação óssea)	126
Anexo 4.	Protocolo de preparo de PBS 1,5 molar e 0,15 molar – 1 litro	127

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	26
OBJETIVOS	27
CAPÍTULO 1: Testosterona além do sistema reprodutor: o papel da testosterona na massa corporal e no metabolismo ósseo	28
REVISÃO DE LITERATURA	30
Osso e tecido ósseo	30
Processo de remodelamento e reparação óssea	31
Propriedades biomecânicas do osso	32
Influência da obesidade no metabolismo ósseo	34
Testosterona e o tecido ósseo	35
Testosterona e a obesidade	37
Papel do Undecilato de Testosterona na reparação óssea	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2: Influência do undecilato de testosterona na massa corporal e na reparação óssea de ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) não obesos	45
INTRODUÇÃO	47
OBJETIVO.....	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
Normas éticas	48
Animais e descrição dos grupos	48
Alimentação	49
Monitoramento e avaliação do ganho de peso/animal	50
Indução de defeito ósseo (ostectomia) monocortical em tíbias	50
Pós-operatório	52
Aplicação dos tratamentos	52
Eutanásia e coleta de amostras	52
Índice de adiposidade	53

Teste de flexão em três pontos	53
Avaliação da composição óssea	54
Massa óssea total.....	54
Massa óssea orgânica	54
Massa óssea mineral.....	55
Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo	55
Descalcificação óssea.....	55
Corte das amostras	55
Desidratação e Diafanização	56
Inclusão em parafina	56
Análise histológica e histomorfométrica das tíbias	56
Análise Estatística	57
RESULTADOS.....	57
Circunferência abdominal	57
Massa corporal	58
Índice de massa corporal (IMC).....	59
Massa do tecido adiposo visceral	61
Índice de adiposidade	61
Massa óssea total.....	62
Massa óssea orgânica	63
Massa óssea mineral.....	64
Força máxima das tíbias.....	65
Deformação até a falha das tíbias.....	66
Módulo de elasticidade.....	67
Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo	68
DISCUSSÃO.....	70
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 3: Influência do undecilato de testosterona na massa corporal e na reparação óssea de ratos (<i>rattus norvegicus</i>) obesos	83

INTRODUÇÃO	85
OBJETIVO.....	86
MATERIAL E MÉTODOS	86
Normas éticas	86
Animais e descrição dos grupos	86
Indução da obesidade	87
Monitoramento e avaliação do ganho de peso dos animais	89
Indução de defeito ósseo (ostectomia) monocortical em tíbias.....	89
Pós-operatório	91
Aplicação dos Tratamentos.....	91
Eutanásia e coleta de amostras	92
Índice de adiposidade.....	93
Teste de flexão em três pontos	93
Massa óssea total.....	94
Massa óssea orgânica	94
Massa óssea mineral.....	95
Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo	95
Descalcificação óssea.....	95
Corte das amostras	95
Análise histológica e histomorfométrica das tíbias.....	96
Análise Estatística	96
RESULTADOS.....	97
Circunferência abdominal	97
Massa corporal	98
Índice de massa corporal (IMC).....	99
Massa do tecido adiposo visceral	100
Índice de adiposidade.....	101
Massa óssea total.....	102
Massa óssea orgânica	103
Massa óssea mineral.....	104

Força máxima das tíbias.....	105
Deformação até a falha das tíbias.....	106
Módulo de elasticidade.....	107
Avaliação histológica e histomorfométrica.....	108
Área de tecido ósseo no foco da lesão.....	110
DISCUSSÃO.....	110
CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS.....	119

INTRODUÇÃO

A reparação óssea é um processo biológico de alta complexidade, que permite o restabelecimento da função óssea e de sua arquitetura e depende diretamente da proliferação celular que ocorre na área lesionada (BARQUET, 2013).

A capacidade do osso de modificar sua forma, regenerar quando lesionado e se renovar, é influenciada por processos mecânicos, hormonais e fisiológicos (DOBLARÉ, 2004), portanto a obesidade pode interferir na reparação óssea por meio de metabolismo osteoarticular (SCHWETZ *et al.*, 2012), pela sobrecarga de peso nos ossos e músculos (FRYE *et al.*, 2016) e pela alteração no fluxo sanguíneo medular (BUDZIK *et al.*, 2017). Além disso, pela ação das adipocinas, o organismo de indivíduos obesos detém a capacidade de alterar a atividade das células envolvidas na regeneração osteocondral (SCHWETZ *et al.*, 2012).

Há uma busca constante pela identificação de medicamentos, fármacos e hormônios capazes de otimizar a consolidação óssea e melhorar a qualidade do calo ósseo (CADORE *et al.*, 2005). A testosterona é um hormônio que atua principalmente na função reprodutiva, mas que também desempenha importante função anabolizante pois aumenta a atividade de tecidos não relacionados ao sistema reprodutor (KLEIN, 2014). Dentre esses tecidos está o ósseo, aonde células como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos possuem receptores androgênicos e sofrem ação direta da testosterona na formação óssea (GOLDS *et al.*, 2016).

A testosterona atua diretamente sobre o osso agindo na estimulação da retenção de cálcio, aumentando a quantidade total de matriz óssea por meio da atividade dos osteoblastos, sendo responsável pelo anabolismo proteico, além de levar ao aumento da massa muscular (CANALI, 2001).

Desta forma a utilização da testosterona ou de seus análogos sintéticos, também chamados de esteroides anabolizantes, podem ser úteis no tratamento de doenças ósseas. Estudos evidenciam efeitos benéficos do uso de esteroides anabolizantes no tratamento de doenças ósseas que cursam com osteopenia (LI *et al.*, 2000), na consolidação de fraturas experimentais induzidas em coelhos (AHMAD *et al.*, 2013) e ainda na prevenção de fraturas em pessoas com osteoporose (FRISOLI *et al.*, 2005).

No mercado existem diversos análogos de testosterona disponíveis para utilização terapêutica (SOUZA; HALLAK, 2010) e o undecilato de testosterona destaca-se por apresentar os efeitos favoráveis em pacientes com diabetes, obesos e com hipogonadismo (HOHL *et al.*, 2009; CHILLARÓN, 2016) e por não interferir na produção espermática quando utilizado em

doses baixa (WEN *et al.*, 2000), sendo considerado a melhor opção terapêutica disponível no Brasil (HOHL *et al.*, 2009).

Não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito do undecilato de testosterona na reparação óssea e na massa corporal da população de ratos não obesos e obesos. Apesar da ação anabólica da testosterona ser bem descrita, e o undecilato de testosterona ser considerado uma boa opção terapêutica, a literatura a cerca de seu uso em todas espécies ainda é escassa, não existindo uma opinião consensual na literatura.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura narrativa a cerca dos efeitos da testosterona e seu análogo undecilato de testosterona, no processo de reparação óssea, bem como sua influência na massa corporal. Objetivou-se ainda, avaliar o efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e no processo de reparação óssea de ratos não obesos e obesos submetidos à ostectomia monocortical em tíbias.

CAPÍTULO 1: Testosterona além do sistema reprodutor: o papel da testosterona na massa corporal e no metabolismo ósseo

RESUMO

A testosterona é um hormônio esteroide responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculina e do estado anabólico dos tecidos. Sua função anabólica vai além dos tecidos relacionados ao sistema reprodutor, desempenhando importante função também no sistema esquelético e na massa corporal. A testosterona, quando aplicada em doses suprafisiológicas é capaz de propiciar aumento de massa magra e massa muscular e redução de massa corporal, circunferência abdominal e gordura visceral. Sua ação no tecido ósseo, é mediada pelos receptores androgênicos presentes nas células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclasto) os quais sofrem ação da testosterona, influenciando na formação e reabsorção óssea. O undecilato de testosterona é um análogo sintético da testosterona de longa ação com poucos efeitos colaterais, e realiza as mesmas ações no organismo que o hormônio testosterona. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura a cerca da influência da testosterona e de seu análogo, undecilato de testosterona, na reparação óssea e na massa corporal. Pode-se concluir que, apesar do undecilato de testosterona ser considerado uma das melhores opções terapêuticas do Brasil, existem poucos estudos que avaliaram seu efeito na reparação óssea e sua influência na massa corporal e por isso, sugere-se que sejam realizados novos estudos.

Palavras-chave: Esteróide, rato, regeneração óssea, ortopedia, gordura.

ABSTRACT

Testosterone is a steroid hormone responsible for the development and maintenance of male sexual characteristics and the anabolic state of tissues. Its anabolic function goes beyond tissues related to the reproductive system, playing an important role in the skeletal system and body mass as well. Testosterone, when applied in supraphysiological doses, is capable of increasing lean and muscle mass and reducing body mass, waist circumference and visceral fat. Its action on bone tissue is mediated by androgen receptors present in bone cells (osteoblasts, osteocytes and osteoclasts) which undergo the action of testosterone, influencing bone formation and resorption. Testosterone undecylate is a long-acting synthetic testosterone analogue with few side effects, and performs the same actions in the body as the hormone testosterone. The aim of this study was to conduct a literature review on the influence of testosterone and its analogue, testosterone undecylate, on bone repair and body mass. It can be concluded that, despite testosterone undecylate being considered one of the best therapeutic options in Brazil, there are few studies that evaluated its effect on bone repair and its influence on body mass and, therefore, it is suggested that further studies should be carried out.

Keywords: Steroid, rat, bone regeneration, orthopedics, fat.

REVISÃO DE LITERATURA

Osso e tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado, estruturado por células espalhadas em uma abundante matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O osso, como órgão, exerce funções de proteção, sustentação e locomoção. Exerce ainda função como reservatório mineral e participa diretamente na hematopoiese (GUYTON; HALL, 2006).

Os ossos podem ser classificados de acordo com sua morfometria, em longos, chatos e curtos. Os ossos longos, como a tíbia, apresentam uma diáfise, caracterizada como o corpo do osso, a qual aloja a cavidade medular; epífises, que estão em suas extremidades, compostas principalmente por osso esponjoso; e metáfise, região de transição entre a diáfise e a epífise (GARTNER; HIATT, 2011).

A estrutura dos ossos longos é dividida em parte cortical (compacto) e esponjosa (trabecular). O osso cortical é caracterizado pela matriz de colágeno organizada sob a forma de lamelas concêntricas, ao redor dos canais de Havers. O osso esponjoso possui trabéculas ósseas e espaços intertrabeculares compostos por medula óssea vermelha, onde ocorre a hematopoiese pelas células mesenquimais (MARX; GARG, 1998).

A matriz óssea é formada por componentes orgânicos e inorgânicos. A porção inorgânica ou também descrita como mineral, é representada em sua maioria por cristais de hidroxiapatita. A porção orgânica é composta por proteínas colágenas e não colágenas. O colágeno tipo I é predominante na matriz orgânica e osteocalcina e a osteopontina são exemplos de proteínas não colágenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células que compõem os ossos são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As células ósseas participam do processo contínuo de renovação e remodelação realizado no tecido ósseo, ocorrendo um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Esses dois processos são intermediados respectivamente por osteoblastos e osteoclastos (COHEN, 2006). Os osteoblastos têm origem a partir de células tronco mesenquimais osteoprogenitoras (KLEIN *et al.*, 2003) e são responsáveis por sintetizar colágeno tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas e participar da mineralização da parte orgânica da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os osteoblastos após passarem por processo de diferenciação, diminuem sua atividade metabólica, ficam envoltos pela matriz óssea e passam a ser denominados de osteócitos (KLEIN *et al.*, 2003). Os osteócitos são derivados de linhagem de osteoblastos e produzem óxido nítrico e prostaglandinas, e ambos são responsáveis por modificarem a atividade de osteoblastos e osteoclastos na osteogênese

(NOTELOVITZ, 2002). Os osteoclastos participam do ciclo de remodelação e tem como principal função a reabsorção óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) em resposta a fatores liberados por osteoblastos. Os osteoclastos são recrutados para a superfície óssea, gerando um ambiente ácido que propicia a dissolução dos componentes orgânicos e minerais do osso. Após realizarem sua atividade fagocitária, os mesmos sofrem apoptose (PEEL, 2009).

Processo de remodelamento e reparação óssea

O tecido ósseo está constantemente modificando sua estrutura (DEMPSTER, 1999). Durante a fase de crescimento de qualquer indivíduo, ocorre o crescimento longitudinal do osso, sendo necessárias adaptações do osso relacionadas à deposição de matriz óssea nas metáfises. Já ao longo de toda a fase adulta, o osso passa por constantes processos de remodelação, buscando renovação do esqueleto e mantendo sua integridade anatômica e estrutural. Essas modificações são descritas pela “lei de Wolf”, a qual declara que a área do osso é proporcional à força mecânica exercida sobre ela (RALSTON, 2005) e que osso se adapta dinamicamente aos estímulos mecânicos, realizando mudanças em sua arquitetura (DINIZ *et al.*, 2005). Dessa maneira, as fraturas ósseas ocorrem quando a carga aplicada sobre determinada região do tecido ósseo supera sua capacidade de resistência (HUISKES; VAN RIETBERGEN, 2005). A capacidade óssea de remodelação também permite manter a estabilidade da calcemia e suprir as necessidades metabólicas do organismo (DEMPSTER, 1999).

A reparação óssea é um processo que requer a ação conjunta de sinalizações bioquímicas para promover fases de angiogênese e osteogênese (LOI *et al.*, 2016) e consequentemente restaurar os danos, preservando a homeostasia dos organismos vivos (SEN; ROY, 2008).

Em termos histológicos, a reparação óssea pode ocorrer de forma primária (direta) ou de forma secundária, denominada de indireta (WEINSTEIN; BUCKWALTER, 2003). A reparação óssea primária é caracterizada pela formação direta de tecido ósseo na linha de fratura, decorrendo da deposição de osso trabecular e seguida da remodelação em osso lamelar com canais de Havers e Volkmann, sem formação de calo (SHALES, 2008). Já a reparação óssea secundária, forma mais comum de reparação, envolve a formação de um calo fibrocartilaginoso, que posteriormente é substituído por calo ósseo (SCHINDELER *et al.*, 2008). A reparação secundária pode ser dividida em três fases. A primeira fase é caracterizada por formação de coágulo sanguíneo, seguido de um processo inflamatório agudo com ativação de macrófagos locais, havendo posterior formação do tecido de granulação (SCHINDELER *et al.*, 2008; LOI *et al.*, 2016). Nesta fase, ocorre a chegada de células que culminam na liberação

de mediadores inflamatórios (SCHINDELER *et al.*, 2008). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegar ao local da lesão óssea, as quais secretam mediadores inflamatórios e quimiotáticos, como IL-6, fazendo então recrutamento de novas células inflamatórias para o local da lesão, como os monócitos e macrófagos. Os macrófagos removem a matriz provisória de fibrina por fagocitose e secretam mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, que iniciam o recrutamento de fibroblastos e células-tronco mesenquimais (LOI *et al.*, 2016). Há diferenciação de células tronco mesenquimais em condrócitos, que produzem cartilagens e posteriormente em osteoblastos (SCHINDELER *et al.*, 2008). Na segunda fase, os osteoblastos depositam matriz óssea mineralizada, utilizando como arcabouso a matriz fibrocartilaginosa previamente depositada e termina com o preenchimento total da linha de fratura (SHAPIRO, 2008). A terceira fase caracteriza-se pela reabsorção do tecido ósseo excessivo (SOUZA, 2003). Nessa fase, a ação dos osteoclastos é primordial pois eles são responsáveis por remover o tecido ósseo promovendo a remodelação (LOI *et al.*, 2016). No final do processo, o calo ósseo tem redução do seu tamanho enquanto o osso atinge o formato próximo à sua apresentação original (BUTTERWORTH; DENNY, 2006).

A remodelação óssea é o principal processo metabólico que regula a estrutura óssea, sendo o osteoclasto a célula responsável pelo início desse processo, o qual há interação de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), assim como a ação de citocinas, hormônios, fatores de crescimento e quimiocinas (NARDUCCI *et al.*, 2011; COHEN, 2016). A remodelação óssea é iniciada pela reabsorção. Nesse processo, a reabsorção óssea, a qual o osteoclasto é responsável, está associada a uma nova formação óssea, pois é ela que garante que haja renovação do osso por meio de uma pequena perda óssea temporária, a qual posteriormente será substituída por uma nova formação óssea, por meio dos osteoblastos (NARDUCCI *et al.*, 2011). A partir do momento em que ocorre um desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea, ou seja, entre as atividades dos osteoclastos e dos osteoblastos, a reabsorção óssea prevalece e então surgem alterações em vários eixos que resultam em doenças como a osteoporose, em que há perda óssea, resultante da alteração da atividade e quantidade de osteoclastos (NARDUCCI *et al.*, 2011; COHEN, 2016).

Propriedades biomecânicas do osso

Os ossos são considerados viscoelásticos, se distendendo vagarosamente sob baixa carga, de forma que quanto maior o tempo de aplicação da carga, mais se distendem (SOUZA *et al.*,

2009). O osso não é uma estrutura completamente rígida ou frágil, e sim uma combinação de ambas características (DINIZ *et al.*, 2005). A resistência e rigidez conferidas ao osso estão relacionadas com a morfologia, porosidade, comprimento e curvatura óssea (ROUSH, 2005). A porção orgânica do osso é responsável pela resistência à fratura, compressão e tração, conferindo maleabilidade tecidual sem que ele perca clinicamente sua dureza. A porção inorgânica confere resistência à deformação (CASTRO JR *et al.*, 2008).

A resistência do osso depende também das propriedades intrínsecas pois quanto maior o conteúdo mineral do osso menor resistência a fraturas porque o osso torna-se mais rígido, quebradiço e menos tolerante a deformação elástica, portanto menos capaz de absorver a energia de um impacto. Por outro lado, a redução do conteúdo mineral do osso, como ocorre no raquitismo, reduz sua dureza o que o torna extremamente elástico se deformando facilmente com a mínima deposição de carga (FORESTIER-ZHANG; BISHOP, 2015).

A lei da elasticidade de materiais sólidos determina a existência de uma relação linear entre força aplicada e deformação de um objeto sólido (GURGEL, 2002). As fraturas ocorrem depois de se aplicar forças excessiva (supra fisiológica) ao osso (ROUSH, 2005). As forças a que os ossos longos estão submetidos podem ser fisiológicas ou não, as quais excedem a resistência limite do osso, originam fraturas (SCHWARZ, 1996).

Quando uma força é aplicada a um objeto bloqueado, este se deforma. Se o objeto reassume conformação original, denomina-se deformação elástica. O ponto de quiescência é quando a carga é aplicada até o ponto em que o objeto não é mais capaz de reverter sua forma original. Quando o objeto sofre deformação e a mesma é permanente, é denominada deformação plástica. O ponto de fratura é obtido quando há continuidade na aplicação da carga (SCHWARZ, 1996).

Ensaio mecânicos (ou testes biomecânicos), são utilizados para determinar as propriedades mecânicas dos materiais, como os ossos, sendo mais frequentemente relatados os de tração, compressão, flexão em três ou quatro pontos, torção, cisalhamento puro, fadiga e micro ou nanopenetração (MELO FILHO *et al.*, 2012). O teste de flexão em três pontos é o método de flexão óssea mais comumente utilizado (FORESTIER-ZHANG; BISHOP, 2015).

Dentre as variáveis obtidas através do teste de flexão em três pontos, a força máxima é definida como a carga máxima que o osso suporta antes de sua fratura. Já a deformação até falha é o máximo de deformação tolerado pelo osso até que frature (FORESTIER-ZHANG; BISHOP, 2015). Quando há maior mineralização óssea, esse valor decresce, tornando o osso mais frágil (TURNER, 2002). O módulo de elasticidade é a resistência à deformação óssea e é um teste reversível, visto que o osso volta à sua forma original quando a carga é removida. O módulo de elasticidade está correlacionado à mineralização do osteóide, tornando o osso mais

resistente à deformação elástica e aumentando o valor do módulo de elasticidade (FORESTIER-ZHANG & BISHOP, 2015).

Influência da obesidade no metabolismo ósseo

A obesidade está ligada à problemas ortopédicos por interferir no metabolismo osteoarticular (SCHWETZ *et al.*, 2012), gerar sobrecarga de peso nos ossos e músculos (FRYE *et al.*, 2016), alterar o fluxo sanguíneo medular (BUDZIK *et al.*, 2017) e pela secreção de substâncias deletérias pelos adipócitos, como ácidos graxos e peptídeos (BRAY, 2004). As alterações ósseas geradas pela obesidade podem permanecer mesmo após a perda de peso (SCHELLER *et al.*, 2016).

As células ósseas e as gordurosas são oriundas da mesma linhagem de células precursoras da medula óssea, capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (BREDELLA *et al.*, 2010). Indícios apontam que a obesidade possa promover a diferenciação destas células-tronco mesenquimais predominantemente em adipócitos, reduzindo as células disponíveis para diferenciação osteoblástica e formação óssea (CAO, 2011).

O tecido adiposo é responsável pela secreção de citocinas inflamatórias, como grelina, resistina e adiponectina as quais possuem relação direta no metabolismo ósseo. Quando desreguladas, essas citocinas geram alterações metabólicas que acarretam perda óssea (VENDRELL *et al.*, 2004), tendo relação direta com à inflamação crônica. O aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes em decorrência da obesidade pode gerar atividade osteoclástica e reabsorção óssea por meio da modificação do receptor ativador de NF-kBETA (RANK), RANK ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (CAO, 2011).

A leptina, secretada pelo tecido adiposo é uma adipocina pró-inflamatória que gera aumento da adipogênese e redução da osteogênese (YUE *et al.*, 2016). A produção excessiva de leptina pelos adipócitos em decorrência da obesidade, pode acarretar em interferências na formação óssea e na reabsorção óssea (CAO, 2011).

No entanto outros mecanismos têm sido propostos para explicar o possível efeito benéfico (ou sinérgico) da obesidade na massa óssea, devido ao efeito positivo estabelecido da carga mecânica conferida pelo peso corporal na formação óssea (CAO, 2011). É geralmente aceito que uma massa corporal maior impõe uma carga mecânica maior ao osso e que a massa óssea aumenta para acomodar a carga maior (ZHAO, 2007).

Testosterona e o tecido ósseo

A testosterona é um hormônio esteroide, andrógeno (NORMAN, 1997) produzido tanto em macho quanto em fêmeas (KLEIN, 2014), sintetizada a partir do colesterol. É secretada nos machos pelas células de Leydig e também no córtex da adrenal (RUBIN, 2004) e nas fêmeas, é produzida em pequenas quantidades nas células da teca, nas adrenais e nos tecidos periféricos, como tecido adiposo, muscular e cutâneo (NORMAN, 1997).

Dentre suas funções, é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculina e do estado anabólico de tecidos, exercendo também uma importante participação na formação, desenvolvimento e manutenção da massa óssea e muscular (NOTELOVITZ, 2002). A função anabolizante desempenhada pela testosterona vai além dos tecidos relacionados ao sistema reprodutor, aumentando a atividade de vários tecidos (KLEIN, 2014), como o tecido ósseo. As células deste tecido, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, possuem receptores androgênicos, os quais estão relacionados com a ação da testosterona na formação óssea (GOLDS *et al.*, 2017).

Os andrógenos, como a testosterona, podem afetar o esqueleto masculino diretamente, através da ativação do receptor de andrógenos e indiretamente, através da estimulação dos receptores de estrógenos após aromatização (NOTELOVITZ, 2002). A aromatização é um processo pelo qual a testosterona e seus sintéticos, realizam a transformação de uma molécula de esteroide nos estrógenos (estradiol e estrona), por meio da enzima aromatase. Essa enzima é responsável por catalisar a transformação da testosterona em estrógeno de forma irreversível. A enzima aromatase têm sido identificada no cérebro e no tecido adiposo (REDONDO; OLIVEIRA, 2007).

A ação direta da testosterona no osso, via sinalização, ocorre por meio do receptor de andrógeno presente em osteoblastos e osteócitos. A sinalização do receptor de andrógeno nos osteoblastos contribui para a formação óssea trabecular. Os osteoblastos são as células ósseas que mais expressam reatividade aos andrógenos, sendo a resposta maior no osso cortical (NOTELOVITZ, 2002). Quando ocorre alteração nos níveis séricos dos andrógenos há um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014) e dessa forma, com a diminuição dos níveis de andrógenos e estrógenos disponíveis, podem aumentar o tempo de vida de osteoclastos e ainda favorecer o processo de apoptose de osteoblastos, o qual será responsável pelo desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (MANOLAGAS *et al.*, 2002).

Um estudo desenvolvido por Vandenput *et.al* (2004), constatou que a testosterona quando administrada de forma sistêmica em camundongos machos foi essencial para formação periostal

óssea e contribuiu para manutenção do osso trabecular e estrutura óssea. A testosterona ainda exerce interferência no crescimento cartilaginoso e na ossificação endocondral (BLOOMBERG, 1991). Realizou-se um estudo em felinos jovens machos e fêmeas, em que se avaliou o fechamento das epífises do rádio de animais inteiros e castrados até sete meses de idade. Concluiu-se que a castração atrasou o fechamento epifisário, reafirmando que a ausência do hormônio atrasa a maturação das epífises (STUBBS, 1996).

A manutenção, formação e desenvolvimento da massa óssea e muscular é influenciada pela ação da testosterona (NOTELOVITZ, 2002). A testosterona aumenta a atividade dos osteoblastos e inibe a retirada de cálcio do organismo ao diminuir a formação e atividade dos osteoclastos. Quando ocorre diminuição da secreção de testosterona, a atividade osteoclástica é maior do que a osteoblástica, reduzindo a formação óssea (WOLFF, 2012). Levando isso em consideração, foi realizado um estudo que mostra a relação direta da castração com a massa óssea. A castração induz osteopenia e osteoporose, pela ausência de testosterona e estrógeno, visto que, esses hormônios exercem função na homeostase óssea, de forma que a orquiectomia em ratos machos adultos acarretou em redução da densidade óssea (BROULÍK; BROULÍKOVA, 2007).

A testosterona atua sobre o cálcio livre citosólico e o metabolismo de fosfolipídios da membrana em osteoblastos (LIEBERHERR; GROSSE, 1996). A sua atuação positiva no osso favorece a retenção de cálcio e fósforo, aumentando a síntese de matriz óssea, por meio do aumento da atividade osteoblástica (CANALI, 2001). Sugere-se que a testosterona influencia na maturação dos osteoblastos, visto que em outro experimento, no qual foi realizada a incorporação da Testosterona ao compósito de poli ácido láctico glicólico, policaprolactona e fosfato de cálcio bifásico (BCP) e avaliada a resposta celular *in vitro* e *in vivo*, foi possível observar que com a incorporação da testosterona ao compósito houve aumento da viabilidade e proliferação dos osteoblastos, além de diferenciação dos osteoblastos, sugerindo que a testosterona tenha influenciado na maturação dos osteoblastos, *in vitro* (COSTA, 2014).

A ação da testosterona também influencia em muitos processos que requerem uma resposta inflamatória, pois a testosterona possui efeito modulador negativo sobre citocinas pró inflamatórias, além de exercer influência nas células do sistema imunológico (FERRUCCI *et al.*, 2005).

Estudos já mostraram efeitos benéficos do uso de testosterona no tratamento de doenças ósseas que cursam com osteopenia (LI *et al.*, 2000), na reparação de fraturas experimentais em coelhos (AHMAD *et al.*, 2013), no controle dos efeitos ósseos deletérios oriundos do uso

crônico de corticoides (CRAWFORD *et al.*, 2003) e na prevenção de fraturas em pessoas com osteoporose (FRISOLI *et al.*, 2005).

Alguns estudos mostram resultados não tão favoráveis quanto ao benefício do uso de esteroides anabolizantes para o tratamento de doenças ósseas como a reparação de fraturas em indivíduos geriátricos (FaROOQI *et al.*, 2016). Ressalta-se ainda que, os esteroides anabolizantes podem apresentar efeitos indesejáveis como danos à medula óssea, ao fígado, ao cérebro e ao próprio tecido ósseo (CARMO *et al.*, 2012). Os efeitos indesejáveis dos esteroides anabolizantes são particularmente importantes no sistema reprodutivo masculino podendo causar oligospermia, azoospermia, alterações de motilidade e morfológicas no espermatozoide e em casos mais graves atrofia testicular. Esses efeitos colaterais são variáveis de acordo com o tipo e dose do esteroide anabolizante (SOUZA; HALLAK, 2010). A maioria dos estudos traz a utilização de doses suprafisiológicas de testosterona em indivíduos que apresentem deficiência da mesma. Dessa forma, acredita-se ainda que altas doses de andrógenos sintéticos podem ser prejudiciais aos ossos devido à supressão da testosterona endógena (e estrogênio), sendo uma preocupação potencial (CLARKE; KHOSLA, 2009).

Testosterona e a obesidade

A obesidade está associada com alterações no perfil hormonal reprodutivo de machos e fêmeas, de forma que homens moderadamente obesos apresentam baixa quantidade de testosterona total (LIMA *et al.*, 2000) e mulheres obesas apresentam excesso de andrógenos (PASQUALI, 2002).

A queda do nível de testosterona total diante da obesidade estaria ligada a menor disponibilidade de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) enquanto os mecanismos responsáveis pelo decréscimo da testosterona livre ainda não são bem elucidados (LIMA *et al.*, 2000). O aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) é descrito então, como um fator negativo em relação ao nível de SHBG (HAMMOUD *et al.*, 2009).

Em um estudo de Nielsen *et al.* (2007), foi demonstrado que os tecidos adiposos viscerais são responsáveis pelo declínio da testosterona livre e testosterona biodisponível, enquanto que a redução da testosterona total e da Dihidrotestosterona (DHT) ocorre pelo aumento do tecido adiposo subcutâneo.

Levando em consideração a baixa de testosterona normalmente observada em indivíduos obesos, têm-se como solução a reposição de testosterona exógena, a qual pode inclusive influenciar diretamente no emagrecimento do indivíduo obeso. A aplicação de

testosterona exógena, em doses suprafisiológicas, é capaz de propiciar redução da taxa de gordura corporal e gerar hipertrofia muscular (HERBST e BHASIN, 2004). A testosterona é considerada um regulador potente da lipólise, influenciando a transdução do sinal da catecolamina nas células de gordura (PETER, 2005).

A testosterona é um hormônio redutor de gordura, exercendo esse efeito por diferentes mecanismos. Ela inibe a captação de lipídios e a atividade da lipoproteína-lipase (LDL) em adipócitos, e estimula a lipólise, aumentando o número de receptores b-adrenérgicos lipolíticos. Também ocorre a diminuição da produção de leptina pelos adipócitos. A testosterona ainda inibe a diferenciação de células precursoras de adipócitos (DE PERGOLA, 2000). O efeito lipolítico da testosterona é mediado por um aumento na atividade da adenilato ciclase, proteína quinase A e lipase sensível a hormônios (DE PERGOLA, 2000)

Em estudos em humanos, ao recebem doses exógenas de testosterona, ocorre uma perda mais rápida da deposição de lipídios e diminuição seletiva da massa gorda no tecido adiposo visceral (PETER, 2005). Abdelhamed *et al.*, 2015, mostraram em seu estudo o efeito da reposição de testosterona na morfologia das células de gordura no tecido adiposo subcutâneo e visceral em ratos machos com idade hipogonadal e o resultado indicou claramente que a terapia de reposição de testosterona diminuiu o tamanho das células de gordura visceral, sendo um modulador importante na síndrome metabólica.

Papel do Undecilato de Testosterona na reparação óssea

Os esteroides-androgênicos são substâncias sintéticas derivadas do hormônio testosterona (ANDRADE, 2002). No mercado existem diversos análogos de testosterona disponíveis para utilização terapêutica como o cipionato de testosterona, o decanoato de nandrolona, undecilato de boldenona e undecilato de testosterona (SOUZA; HALLAK, 2010).

O uso dos análogos de testosterona, tem sido indicado como adjuvante no tratamento no reparo de lesões ósseas, tendo resultados promissores em seres humanos (AHMAD *et al.*, 2013). Esses andrógenos aumentam a síntese de proteínas na matriz extracelular, como o colágeno tipo 1, osteocalcina e osteonectina, além de aumentar a diferenciação de osteoblastos, estimulam a mineralização óssea e regulação e produção de matriz óssea (NOTELOVITZ, 2002).

O undecilato de testosterona (Nebido[®], Bayer, Brasil) é um análogo da testosterona de longa ação indicado para reposição de testosterona em hipogonadismo masculino primário e

secundário. Estudos destacaram que este medicamento apresenta bons efeitos em pacientes com diabetes, obesos e com hipogonadismo (CHILLARÓN, 2016) e que não gera interferências na produção espermática quando utilizado em doses baixa (WEN *et al.*, 2000). Portanto, é considerado a melhor opção terapêutica disponível no Brasil (HOHL *et al.*, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como evidenciado no decorrer desse capítulo, a testostereona e seus análogos exercem influência no metabolismo e desenvolvimento de tecidos não reprodutivos como o tecido ósseo. Desta forma, foi possível observar que a utilização da testosterona e de seus análogos sintéticos, podem ser úteis no tratamento de doenças ósseas e que são capazes de otimizar o processo de reparação óssea em indivíduos com níveis de testosterona endógena insuficientes.

Além disso, observou-se também, que com a aplicação de testosterona exógena em doses suprafiológicas, a mesma pode propiciar redução da taxa de gordura corporal, sendo a testosterona um possível aliado na perda de peso de indivíduos que sofrem de obesidade.

Apesar dos benefícios já descritos na literatura a cerca da utilização da testosterona, ainda são poucos os relatos referentes à utilização de seu análogo, undecilato de testosterona, e se este é capaz de gerar interferência no processo de reparação óssea e na massa corporal em indivíduos normais, sem deficiência de testosterona endógena. Levando em consideração que o Undecilato de testosterona é descrito como uma das melhores opções terapêuticas no Brasil, sugere-se que sejam realizados novos estudos a cerca de sua utilização voltado para o processo de reparação óssea e massa corporal.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, A.; HISASUE, S.; SHIRAI, M. et al. Testosterone replacement alters the cell size in visceral fat but not in subcutaneous fat in hypogonadal aged male rats as a late-onset hypogonadism animal model. **Research and reports in urology**, v.7, p.35–40, 2015.
- AHMAD, F.; YUNUS, S.M.; AGGHAR, A. et al. Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits - a study on experimental model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.1, p.93-96, 2013.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388p., 2002.
- BARQUET, C.; PINHEIRO, L.A. D.; TOMANIK, M.M. Fisioterapia no pós-operatório de fratura proximal do fêmur em idosos. Revisão da literatura. **Acta ortopédica brasileira** v.21, n.3, 2013.
- BRAY, G. A. Medical Consequences of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583–2589, 2004.

BREDELLA, M. A.; TORRIANI, M.; GHOMI, R. H. et al. Vertebral Bone Marrow Fat Is Positively Associated With Visceral Fat and Inversely Associated With IGF-1 in Obese Women. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 49–53, 2010.

BUDZIK, J.F.; LEFEBVRE, G.; BEHAL, H. et al. Bone marrow perfusion measured with dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging is correlated to body mass index in adults. **Bone**, v. 99, p. 47-52, 2017.

BROULÍK, P.D.; BROLULÍKOVÁ, K. Raloxifen prevents bone loss in castrated male mice. **Physiological Research**, v.56, p. 443-447, 2007.

CADORE, E.L.; MICHEL, A.B.; KRUEL, L.F.M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.11, n.6, p.373-379, 2005.

CARMO, C.A.; GONÇALVES, A.L.; SALVADORI, D.M. et al. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. **Journal of Applied Toxicology**, v.32, n.10, p.810-814, 2012.

CANALI, E.S.; KRUEL, L.F.M. Respostas hormonais ao exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, v.15, n.2, p.141-153, 2001.

CAO, J.J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 6, p. 1-7, 2011.

CASTRO, JR. A.F; CASTRO, B.K.; SILVEIRA, L.L.N. et al. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.27-32, 2008.

CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Androgens and bone. **Steroids**, v.74, n.3, p.296–305, 2009.

CHILLARÓN, J.J.; MIRO, M.F.; ALBAREDDAS, M. et al. Testosterone undecanoate improves lipid profile in patients with type 1 diabetes and hypogonadotrophic hypogonadism. **Endocrine Journal**, v.63, n.9, p. 849-855, 2016.

COHEN, S. Role of RANK ligand in normal and pathologic bone remodeling and the therapeutic potential of novel inhibitory molecules in musculoskeletal diseases. **Arthritis Rheum.**, v.55, n.1, p.15-8, 2006.

COSTA, K. J. R. **Efeito da incorporação da testosterona ao compósito de poli ácido láctico-coglicólico/policaprolactona/fosfato de cálcio bifásico na resposta biológica in vitro e in vivo**. 2014. 229f. Tese (doutorado em odontologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

CRAWFORD, B.A.; LIU, P.Y.; KEAN, M.T. et al. Randomized placebo-controlled trial of androgen effects on muscle and bone in men requiring long-term systemic glucocorticoid treatment. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.88, n.7, p.3167-3176, 2003.

DE PERGOLA, G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. **International Journal of Obesity**. v.24, p.59-63, 2000.

DEMPSTER, D.W.; New concepts in bone remodeling. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Dynamics of bone and cartilage metabolism. San Diego: **Academic Press**, Cap. 18, p.261-73, 1999.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4. Ed. São Paulo: Roca, 496 p, 2006.

DINIZ, J.S. et al. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9/ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5.,2005. São José dos Campos. **Anais..** São Jose dos campos: Universidade do Vale do Paraíba, p. 1364-8, 2005.

DOBLARÉ, M.; GARCIA J.; GÓMEZ, M. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics** v.71, n.13, p.1809–1840, 2004.

FAROOQI, V.; BERG, M.E.L; CAMERON, I.D. et al. Anabolic steroids for rehabilitation after hip fracture in older people. **Sao Paulo Medical Journal**, v.134, n.5, p.467-468, 2016.

FERRUCCI, L.; CORSI, A.; LAURETANI, F. et al. The origins of age-related proinflammatory state. **Blood**, v.105, n.6, p. 2294-2299,2005.

FRISOLI A, J.R.; CHAVES, P.H.; PINHEIRO, M.M. et al. The effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobinlevels in elderly women with osteoporosis: a double-blind, randomized, placebo-controlledclinical trial. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v.60, n.5, p.648-653, 2005.

FRYE, C.W.; SHMALBERG, J.W.; WAKSHLAG, J.J. Obesity, Exercise and Orthopedic Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.46, n.5, p.831-841, 2016.

FORESTIER-ZHANG, L. & BISHOP, N. Bone strength in children: understanding basic bone biomechanics. **Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition**, v. 101, n. 1, p. 2–7, 2015.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

GOLDS, G.; HOUDEK, D.; ARNASON, T. Male Hypogonadism and Osteoporosis: The Effects, Clinical Consequences, and Treatment of Testosterone Deficiency in Bone Health. **International Journal of Endocrinology**, v.2017, p.1-15, 2017.

GURGEL, J.L. **Respostas ósseas a cargas mecânicas**. 103f. Memória de licenciatura apresentada ao Instituto de Educação Física e Desportos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2002.

GUYTON; HALL. **Tratado de fisiologia médica**. 11a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2006.
HAMMOUD, A.; GIBSON, M.; HUNT, S. Cet al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on the sex steroids and quality of life in obese men. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.94, n.4, p.1329-32, 2009.

HERBST, K. L.; BHASIN, S. Testosterone action on skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.7, n.3, p. 271–277, 2004.

HOHL, A.; MARQUES, M.O.T.; CORAL, M.H.C. et al. Evaluation of late-onset hypogonadism (andropause) treatment using three different formulations of injectable testosterone. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.8, p.989-995, 2009.

HUISKES, R.; VAN RIETBERGEN, B. Biomechanics of bone. In: MOW, V.C. HUISKES, R. **Basic orthopaedic biomechanics and mechanobiology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap.4, p.123-180, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: **Histologia Básica**. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 136–56, 2004.

KLEIN, B.G. **Cunningham Tratado de fisiologia veterinária** – 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.624, 2014.

KLEIN, P.; SCHELL, H.; STREITPARTH, F. et al. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. **Journal of Orthopaedic Research.**; v.21, n.4, p.662-669, 2003.

LI, X.; TAKAHASHI, M.; KUSHIDA, K. et al. The effects of nandrolone decanoate on bone mass and metabolism in ovariectomized rats with osteopenia. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.18, n.5, p.258-263, 2000.

LIEBERHERR, M.; GROSSE, B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive g-protein. **The journal of biological chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7217-7223, 1996.

LIMA, N.; CAVALIERI, H.; HALPERN, A. et al. A função gonadal do homem obeso. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**, v.44, n.1, p.31-37, 2000.

LOI, F.; CÓRDOVA, L.A.; PAJARINEN, J.; LIN, T.H.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**. 86:p.119-130, 2016.

MANOLAGAS, S.C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R.L. Sex steroids and bone. **Recent Progress Hormone Research**, v.57, p. 385-409, 2002.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent**, v.7, n.4:267-76, 1998.

MELO FILHO, E.V. et al. Utilização da tomografia computadorizada quantitativa como teste de resistência para avaliação de placas ósseas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.3, p.766- 768, 2012.

NARDUCCI, P.; BAREGGI, R.; NICOLIN, V. Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology. **Acta Histochem**, v.113, n.2, p. 73-81, 2011.

NEVES, S. M. P.; PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Experimentação da FCF-IQ/USP**. Silvânia M. P. Neves (et al.) – São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p. il.

NIELSEN, T.L.; HAGEN, C.; WRAAE, K. et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.92, n.7, p.2696-705, 2007.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Steroids hormones: chemistry, biosynthesis and Metabolism. In:_____. **Hormones**. 2. Ed. San diego: academic press,1997.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and sterility**, v. 77, n. 4, p. 34-41, 2002.

PASQUALI, R.; VICENNATI, V.; GAMBINERI, A. Adrenal and gonadal function in obesity. **Journal Endocrinology Investigation**. V. 25, n.10, p.893-8, 2002.

PEEL, N. Bone remodelling and disorders of bone metabolism. **Surgery**, v. 27, n. 2, p. 70–74, 2009.

PETER, A. Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome. **Biochimie**, v.87, p.39-43, 2005.

PF AFF, D. W.; PHILLIPS, M. I.; RUBIN, R. T. Hormone metabolites can be the Behaviorally active compounds in: _____. **Principles of hormonal behavior Relations**. Califórnia: elsevier academic press, p. 61-15, 2004.

RALSTSON, S. Structure and metabolism of bone. **Calcium and Bone**, v. 33, n. 12, p. 58–60, 2005.

REDONDO, Fernanda Roberta Roque; OLIVEIRA, E. M. **Efeitos do uso de esteróides anabolizantes associados ao treinamento físico de natação sobre o fluxo sanguíneo para o miocárdio de ratos normotensos**. 2007.Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROUSH, J. K. Management of fractures in small animals. Veterinary clinics small Animal practice, v. 35, n. 5, p. 1137-1154, 2005.

SALAMERI, K. R.; OLSON, P. N.; BLOOMBERG, M. S. Elective gonadectomy in dogs: a review. **Journal of the american veterinary medical association**., v. 198, n. 7, p. 1183-1192, 1991.

SHALES, C. Fracture management in small animal practice: triage and stabilization. In **Practice**, vol. 30, p. 314-320, 2008.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European Cells & Materials Journal**. V.1, n.15, p.53-76, 2008.

SCHELLER, E.L.; KHOURY, B.; MOLLER, K.L. et al. Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss. **Frontiers in Endocrinology** (Lausanne), v.7, p.1-13, 2016.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P. et al. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Semin Cell Development Biol.**, 108(1):5-13, 2008.

SCHWARZ, P.D. Biomecânica das fraturas do esqueleto apendicular: causas e avaliação. In: BOJRAB, M.J. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Manole, 1996.

SCHWETZ, V.; PIEBER, T.; OBERMAYER-PIETSCH, B. The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. **European Journal of Endocrinology**, v.166, n.6, p.959-967, 2012.

SEN, C.K.; ROY, S. Redox signals in wound healing. **Biochem Biophys Acta**, v.1780, n.1, p.1348-1361, 2008.

SOUZA, G.L.; HALLAK, J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. **BJU international**, v.108, n.11, p.1860-1865, 2011.

SOUZA, V. L. Efeitos do ultra-som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fraturas de ossos longos (rádio e ulna, fêmur, tíbia e fíbula) em cães (Canis familiaris). **Dissertação** (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2003.

SOUZA, R.A. et al. Propriedades mecânicas do tecido ósseo e risco de fraturas. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓSGRADUAÇÃO, 5., São José dos Campos-SP. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

STUBBS, W.P.; BLOOMBERG, M.S.; SCRUGGS, S.L. et al. Effects of prepubertal gonadectomy on physical and behavioral development in cats, **Journal of the american veterinary medical association**, v. 209, n.11, p. 1864-1871, 1996.

TURNER, C. H. Biomechanics of Bone: Determinants of Skeletal Fragility and Bone Quality. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 2, p. 97–104, 2002.

VANDENPUT, L.; SWINNEN, J. V. et al. Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.19, n.9, p. 1462-1470, 2004.

VANDERSCHUEREN, D.; LAURENT, MR.; CLAESSENS, F. et al. Sex steroid actions in male bone. **Endocrine Reviews**, v.35, n.6, p. 906-60, 2014.

VENDRELL, J.; BROCH, M.; VILARRASA, N. et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v.12, p.962-971, 2004.

WEINSTEIN, S.; BUCKWALTER, J. A. Musculoskeletal tissue healing. In: **Turek. Orthopaedics: principles and their application**. 6a ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, p. 31-112, 2003.

WEN, X.H.; WANG, X.H.; TONG, J.S. et al. Reversible effect of testosterone undecanoate injection on spermatogenesis in rats. **Asian J Androl**, v.2, n.3, 207-211, 2000.

WOLFF, Roberta Bastos et al. Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 493-497, 2012.

YUE, R.; ZHOU, B.O.; SHIMADA, I.S. et al. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating MesenchymalStromal Cells in Adult Bone Marrow. **Cell Stem Cell**, v.18, n.6, p.782-796, 2016.

CAPÍTULO 2: Influência do undecilato de testosterona na massa corporal e na reparação óssea de ratos (*Rattus norvegicus*) não obesos

RESUMO

Objetivos: avaliar o efeito do undecilato de testosterona na reparação óssea de *Rattus norvegicus* não obesos submetidos à ostectomia monocortical em tíbia e sua influência na massa corporal. **Material e métodos:** 54 *Rattus norvegicus*, de linhagem Wistar, machos, com idade de 3 meses e peso médio de 220 gramas. Foram divididos em três grupos: placebo (n=24), undecilato (n=24) e controle (n=6). Os animais dos grupos placebo e undecilato foram submetidos à ostectomia óssea monocortical em suas tíbias e receberam aplicações semanais de placebo ou undecilato, enquanto os animais do grupo controle não foram submetidos à ostectomia e não foi realizada a aplicação de nenhum tratamento. Os animais dos grupos placebo e undecilato foram avaliados aos três dias, sete, 19 e aos 28 dias após lesão e os animais do grupo controle foram avaliados no dia sete. Foram coletados os dados de massa corporal, circunferência abdominal e comprimento nasoanal para à monitoração da massa corporal. Foram coletadas as gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal para realização do cálculo de índice de adiposidade. As tíbias direitas foram destinadas à avaliação por meio do teste de flexão em três pontos; avaliação da massa óssea total, mineral e orgânica; e avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo. **Resultados:** O grupo undecilato apresentou menor circunferência abdominal quando comparado com grupo placebo. A avaliação da massa corporal mostrou que os animais do grupo undecilato apresentaram massa corpórea mais elevada do que o grupo placebo. O grupo undecilato apresentou maior massa de tecido adiposo visceral do que o grupo placebo, mas não houve diferença no índice de adiposidade. O grupo undecilato apresentou maior massa óssea orgânica nos tempos de avaliação, quando comparado com os grupos placebo e controle. Não houve diferença no valor de força máxima, deformação até a falha e módulo de elasticidade entre os grupos placebo e undecilato. A histologia mostrou que a reparação ocorreu de forma semelhante no grupo placebo e undecilato. A avaliação histomorfométrica evidenciou maior área de tecido ósseo do grupo undecilato quando comparado com o grupo controle (sem lesão). **Conclusão:** O undecilato de testosterona foi capaz de induzir anabolismo na massa corporal dos animais, porém não reduziu a gordura visceral. Além disso, ele não agiu de forma expressiva no processo de reparação óssea.

Palavras-chave: Hormônio esteroide, rato, regeneração óssea, ortopedia.

ABSTRACT

Objectives: to evaluate the effect of testosterone undecylate on bone repair of non-obese *Rattus novergicus* undergone monocortical ostectomy in tibia and its influence on body mass.

Material and methods: 54 male *Rattus novergicus*, Wistar strain, 3 month-old, weighing 220 grams. They were divided into three groups: placebo (n=24), undecylate (n=24) and control (n=6). The animals in the placebo and undecylate groups were submitted to undergo tibial monocortical ostectomy and received weekly applications of placebo or undecylate and the animals in the control group were not submitted to ostectomy and no treatment was applied. The animals in the placebo and undecylate groups were evaluated at three, seven, 19 and 28 days after injury and the animals in the control group were evaluated on day seven. The animals were weighed and measured, and data on body mass, waist circumference and nasoanal length were collected and destined for monitoring body mass. Retroperitoneal, mesenteric and perennial fat were collected to calculate the adiposity index, which was used to exclude obese animals from the experiment. The right tibias were collected and destined for evaluation through the three-point flexural test; assessment of total, mineral and organic bone mass; and histological and histomorphometric evaluation of bone tissue.

Results: The undecylate group had lower waist circumference when compared to the placebo group. The evaluation of body mass showed that animals in the undecylate group had higher body mass than those in the placebo group. The undecylate group had a greater visceral adipose tissue mass than the placebo group, but there was no difference in the adiposity index. The undecylate group had greater organic bone mass at the time of assessment when compared to the placebo and control groups. There was no difference when comparing the value of ultimate strength, ultimate displacement, modulus of elasticity between the placebo and undecylate groups. Histology showed that repair occurred similarly in the placebo and undecylate group. The histomorphometric evaluation showed a larger area of bone tissue in the undecylate group when compared to the control group (no lesion).

Conclusion: Testosterone undecylate was able to induce anabolism in the body mass of animals, but it did not reduce visceral fat. Furthermore, it did not act in an expressive way in the bone repair process.

Keywords: Steroid hormone, rat, bone regeneration, orthopedics.

INTRODUÇÃO

Lesões ou defeitos ósseos ocorrem nas mais variadas situações clínicas e o processo de reparação óssea é um importante passo para a reabilitação do paciente. Em virtude do potencial de regeneração espontânea dos ossos, algumas lesões reparam-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais (ALSBERG *et al.*, 2002) porém, inúmeras situações exigem intervenções que estimulem a reparação óssea, como a utilização de hormônios capazes de otimizar a consolidação óssea e melhorar a qualidade do calo ósseo (CADORE *et al.*, 2005).

Os hormônios sexuais exercem grande influência no metabolismo e desenvolvimento de todo o esqueleto, atuando também em tecidos não reprodutivos, incluindo o ósseo. As células ósseas como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos possuem receptores androgênicos e sofrem ação direta da testosterona na formação óssea (GOLDS *et al.*, 2016). Nos órgãos sexuais, existem um maior número de receptores para a testosterona, havendo maior resposta relacionada a processos reprodutivos do que resposta anabólica nestes tecidos. Em contrapartida, no sistema esquelético as ações anabólicas são mais evidentes (CUNHA *et al.*, 2004).

Desta forma, a testosterona interfere no crescimento e amadurecimento cartilaginoso e ainda na ossificação endocondral, facilitando o crescimento das cartilagens e a maturação nas epífises (BLOOMBERG, 1991).

A testosterona também atua sobre o osso estimulando a retenção de cálcio, o que aumenta a quantidade total de matriz óssea em decorrência do aumento da atividade dos osteoblastos, além de estimular o anabolismo proteico, proporcionando aumento da massa muscular (CUNHA *et al.*, 2012).

Existem diversos análogos de testosterona disponíveis para utilização terapêutica (SOUZA; HALLAK, 2010) e o undecilato de testosterona destaca-se por apresentar efeitos favoráveis em pacientes com diabetes, obesos e com hipogonadismo (HOHL *et al.*, 2009; CHILLARÓN, 2016), podendo ser um bom aliado na otimização da reparação óssea.

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e no processo de reparação óssea de ratos não obesos submetidos à ostectomia monocortical em tíbias.

MATERIAL E MÉTODOS

Normas éticas

O projeto de pesquisa foi conduzido conforme os princípios éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba – CEEA/UNIUBE, sob o protocolo do nº 028/2019. O projeto foi realizado no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba e nos laboratórios de Química, Histopatologia e Biologia Molecular e Celular da Universidade de Uberaba (Anexo 1).

Animais e descrição dos grupos

Foram utilizados 54 *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e peso médio de 220 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba, os quais foram inseridos no biotério com atestado prévio de sanidade, sendo livres de patógenos. Foram alojados em caixas de 41 cm de comprimento, 34 cm de profundidade e 18 cm de altura com quatro animais cada, mantidos sob umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas e água *ad libitum*. Inicialmente, no período de adaptação de 15 dias, a alimentação se deu de forma *ad libitum* com ração comercial balanceada para roedores (Labina®, Presence, Brasil). Posteriormente os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: placebo, undecilato e controle. Esses animais receberam 20 gramas diária por rato de ração comercial (NEVES *et al.*, 2013) da marca Labina® (Presence, Brasil). Os animais dos grupos placebo e undecilato foram submetidos a protocolos anestésicos e cirúrgicos (detalhados a seguir) para indução de defeito ósseo monocortical (ostectomia) em ambas as tíbias e cada grupo foi avaliado aos dias três, sete, 19 e 28 de pós-operatório, denominados como D3, D7,19 e D28 respectivamente. Utilizou-se seis animais por tempo de avaliação. Os animais do grupo controle não foram submetidos à ostectomia. Os animais do grupo undecilato receberam aplicações semanais de Undecilato de testorona 250 mg/ml (Nebido®, Bayer, Brasil) na dose de 8 mg/kg (WEN *et al.*, 2000) via subcutânea, enquanto os animais do grupo placebo receberam aplicação semanais de solução fisiológica 0,9% (Sanobiol®, Brasil) no volume de 0,01 ml/animal via subcutânea (Figura 1). Os animais do grupo controle não receberam aplicação de nenhum fármaco ou solução e foram avaliados no dia sete.

- ✓ Placebo: Animais submetidos à ostectomia proximal de tibia com posterior aplicação de solução fisiológica, alimentados com dieta comercial balanceada (n=24);
- ✓ Undecilato: Animais submetidos à ostectomia proximal de tibia com posterior aplicação de undecilato de testosterona, alimentados com dieta comercial balanceada (n=24);
- ✓ Controle: Animais que não foram submetidos à ostectomia proximal de tibia e não receberam aplicação de tratamento, alimentados com dieta comercial balanceada (n=6).

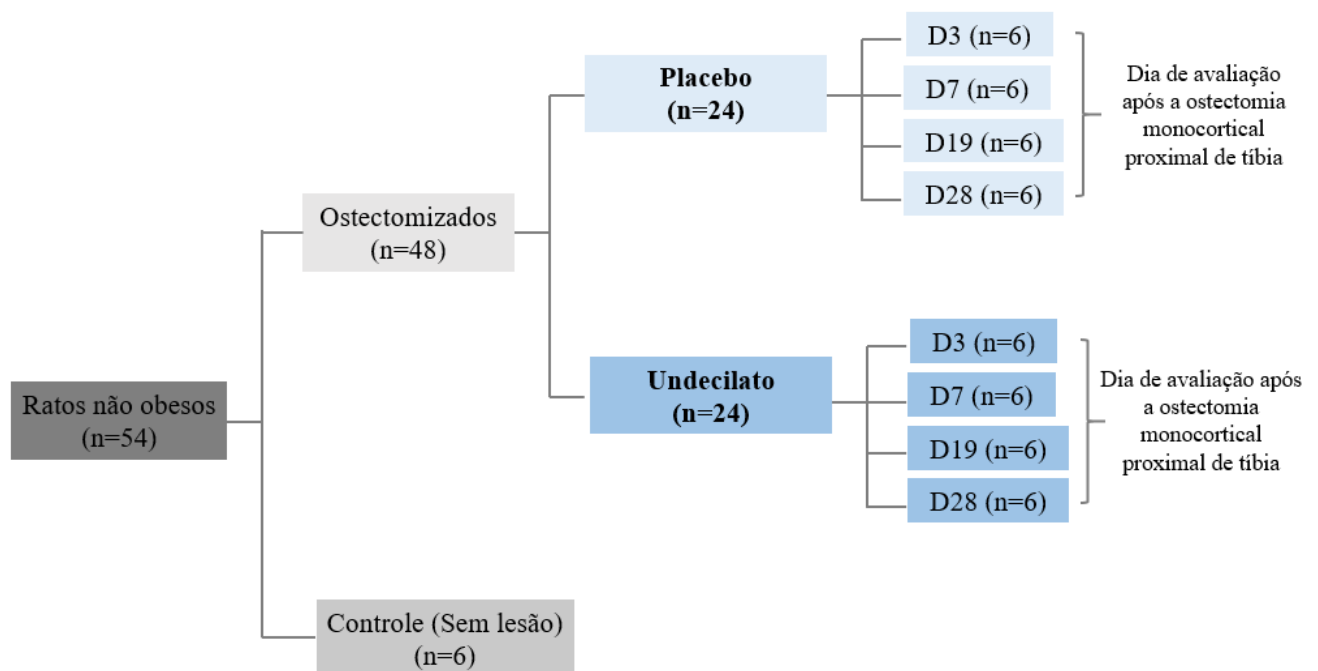


Figura 1 - Representação esquemática dos grupos experimentais empregados no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Grupo placebo: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tibia (ostectomia) com posterior aplicação de placebo; Grupo undecilato: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tibia (ostectomia) com posterior aplicação de undecilato de testosterona; e Controle: não realizada indução do defeito ósseo monocortical em tibia (ostectomia) e sem aplicação de tratamento.

Alimentação

Foi estabelecido o fornecimento de 20 gramas diária/rato de ração (NEVES *et al.*, 2013) comercial balanceada da marca Labina® para ratos e camundongos (Presence, Brasil), para os animais por 60 dias. Sua composição, segundo as informações do fabricante é de, aproximadamente, 12,5% taxa de umidade, 23% de proteína bruta, 4% de extrato etéreo, 5% de fibra bruta e 9% de matéria mineral. A ração foi administrada sempre no mesmo horário e a

quantidade diária foi pesada em balança de alta precisão de 0,5 gramas (C&F P-15[®], C&F Comércios e Serviços Eireli, Brasil).

Monitoramento e avaliação do ganho de peso/animal

Todos os animais envolvidos no experimento foram pesados em uma balança de precisão de 0,5 gramas (C&F P-15[®], C&F Comércios e Serviços Eireli, Brasil) logo ao serem alojados no biotério. Posteriormente, os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento até o dia da cirurgia, no qual foi realizada uma pesagem pré-operatória. Após isso, os animais foram submetidos à última pesagem, no dia da eutanásia. Também foi realizada a mensuração da circunferência abdominal e do comprimento nasoanal de cada rato semanalmente e no dia da eutanásia, com o auxílio de uma fita métrica, medidas as quais foram necessárias para a realização do cálculo de índice de massa corporal (IMC) (NOVELLI *et al.*, 2007).

O cálculo de IMC realizado com as medidas obtidas dos animais no dia da cirurgia, foi utilizado para descartar a ocorrência de obesidade entre os animais. O IMC foi calculado segundo a fórmula: $IMC = \text{Peso (g)} / \text{comprimento nasoanal (cm}^2\text{)}$. Animais com o IMC de 0,45 /cm² até 0,68/cm² (NOVELLI *et al.*, 2007) foram considerados não obesos. Afim de confirmar a não obesidade, foi realizado o índice de adiposidade através dos valores obtidos na pesagem das gorduras coletadas pós-eutanásia.

Indução de defeito ósseo (ostectomia) monocortical em tíbias

Para realização da indução de defeito ósseo monocortical nas tíbias dos ratos, os animais foram submetidos ao jejum hídrico e sólido de 12 horas antes do procedimento.

O protocolo anestésico utilizado foi morfina (Dimorf[®], Cristália, Brasil) na dose de 4 mg/kg via subcutânea (SC), seguido de aplicação de cetamina 10% (Cetamin[®], Syntec, Brasil) na dose de 70 mg/kg via intraperitoneal (IP) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin[®], Syntec, Brasil) na dose de 4 mg/kg via IP. Logo em seguida, foi realizada uma tricotomia ampla de ambos os membros pélvicos e feita a aplicação de antibiótico enrofloxacina 10% (Kinetomax[®], Elanco, Brasil) na dose de 10 mg/kg via SC.

Já na sala cirúrgica, realizou-se a antissepsia de ambos os membros pélvicos do animal. Com o auxílio de gazes estéril, aplicou-se clorexidina degermante a 2% (Riohex[®], Rioquímica, Brasil) e clorexidina alcoólica 0,5% (Riohex[®], Rioquímica, Brasil), repetindo de forma intercalada três vezes cada um em ambos os membros.

Com os ratos em decúbito dorsal, o campo operatório foi delimitado por meio de campos cirúrgicos descartáveis de poliestireno (SMS, Soluções industriais, Brasil). O acesso a tibia foi feito por uma incisão longitudinal craniomedial à porção proximal da tibia, de aproximadamente 1,5 cm, e logo em seguida o tecido subcutâneo foi divulsionado até a exposição do periósteo (Figura 2 - A). Em seguida, foi realizado bloqueio anestésico local, instilando bupivacaína 0,5% (Neocaína®, Cristália, Brasil) diluída a 0,05% em solução fisiológica estéril, na ferida cirúrgica, para realização do procedimento de perfuração. Com uma broca de 2 mm de diâmetro acoplada à uma furadeira com rotação controlada e autoclavável foi criado um defeito ósseo monocortical na face medial da porção proximal da tibia (Figura 2 - B). Em seguida, o defeito ósseo foi lavado (Figura 2 - C) com solução de Cloreto de Sódio 0,9% (Sanobiol®, Brasil) para remoção de resquícios ósseos (Figura 2 - D). O espaço morto do subcutâneo foi reduzido em padrão simples contínuo, seguido por uma sutura subcuticular para aproximação de pele (Figura 2 - E) com nylon 4-0 (mononailon 4-0®, Ethicon, Brasil). O mesmo procedimento foi realizado no membro contralateral.

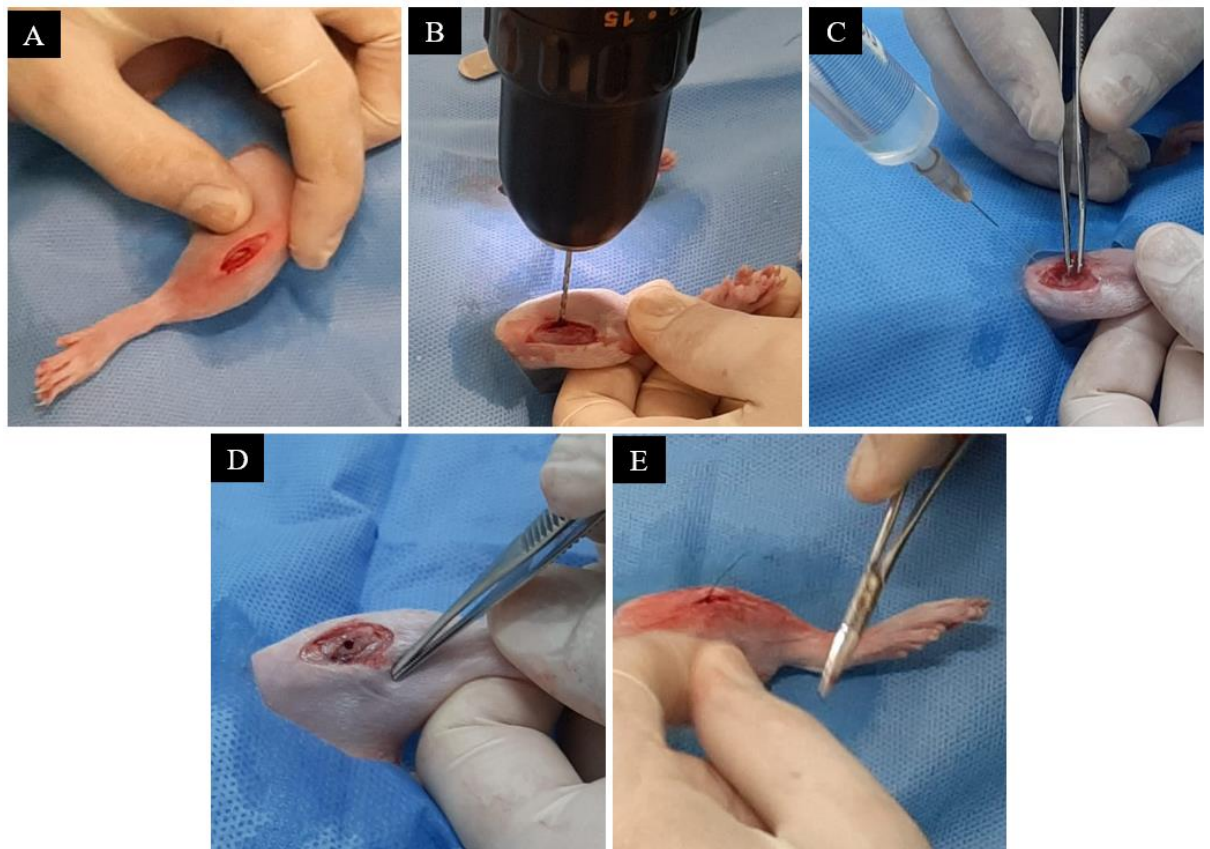


Figura 2 - Indução do defeito ósseo monocortical em tibia de rato Wistar não obeso empregado no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Realizada uma incisão de pele craniomedial à região proximal de tibia, de aproximadamente 1,5 cm, divulsão do tecido subcutâneo e exposição do periósteo (A). Defeito ósseo induzido com o auxílio de uma broca de 2 mm de diâmetro acoplada à uma furadeira ortopédica autoclavável (B). Lavagem do defeito ósseo com solução de Cloreto de Sódio 0,9% para remoção de resquícios ósseos (C e D). Abolição do espaço morto do subcutâneo em padrão simples contínuo, seguido por uma sutura subcuticular para aproximação de pele com nylon 4-0 (E).

Pós-operatório

Os animais foram mantidos em caixas e aquecidos com bolsas térmicas. O monitoramento dos animais foi realizado até sua completa recuperação anestésica quando foi realizada analgesia com Cloridrato de tramadol (Tramal[®], Pfizer, Brasil) 5 mg/kg SC, sendo repetida após 12 horas.

Aplicação dos tratamentos

No pós-operatório imediato, os animais do grupo undecilato receberam aplicação de 8 mg/kg de Undecilato de Testosterona 250 mg/ml (Nebido[®], Bayer, Brasil) via subcutânea próximo à região inguinal, sendo aplicado no lado direito. Os animais do grupo placebo receberam 0,01 ml de solução fisiológica 0,9% (Sanobiol[®], Brasil), volume similar ao recebido pelos animais do grupo undecilato.

Os animais do grupo undecilato receberam aplicação de Undecilato de Testosterona 250 mg/ml (Nebido[®], Bayer, Brasil), na dose de 8 mg/kg, (WEN *et al.*, 2000) via subcutânea, a cada sete dias, sendo realizada sempre no lado contralateral da última aplicação. Os animais referentes ao tempo de eutanásia D3 e D7, receberam apenas uma aplicação (no dia da cirurgia). Aqueles pertencentes aos D19 receberam três aplicações e os pertencentes ao D28, quatro aplicações.

Os animais do grupo placebo receberam aplicação de um volume de 0,01 ml de solução fisiológica 0,9% (Sanobiol[®], Brasil), via subcutânea e a cada sete dias, sendo realizado sempre no lado contralateral da última aplicação. A escolha do volume padrão de 0,01 ml de solução fisiológica 0,9% independente do peso do animal, baseou-se em um volume similar ao que foi recebido pelos animais do grupo undecilato.

Os animais do grupo controle não receberam aplicação de nenhum tratamento.

Eutanásia e coleta de amostras

Como estabelecido previamente, seis animais de cada grupo (placebo e undecilato) foram submetidos a eutanásia nos dias três, sete, 19 e 28 (denominados de D3, D7, D19 e D28), sendo os dias contados a partir do dia da cirurgia. Os animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia no dia sete a contar do início das cirurgias dos outros animais.

Inicialmente, os animais foram submetidos à aprofundamento anestésico com cetamina (Cetamin[®], Syntec, Brasil) na dose de 180 mg/kg e xilazina (Xilazin[®], Syntec, Brasil) na dose

de 30 mg/kg, IP. Logo em seguida, os animais foram pesados e medidos, sendo coletados os dados massa, circunferência abdominal e comprimento nasoanal.

A partir do momento que o animal perdeu totalmente seus reflexos e o estímulo de sensibilidade dolorosa, foi iniciada a coleta das amostras. Realizou-se uma incisão abrindo a cavidade abdominal com o auxílio de uma tesoura, seguida de punção da veia cava até gerar choque hipovolêmico, o qual levou os animais à óbito. Posteriormente, realizou-se a coleta e pesagem das gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal para avaliação da massa adiposa e do índice de adiposidade. As gorduras foram lavadas em solução fisiológica, secadas em papel toalha, pesadas em balança de alta precisão de 0,005 gramas (Gehaka BK 600®, Gehaka, Brasil) e fixadas em formalina tamponada a 10% (Anexo 2) por 48 horas e depois em álcool 70% (Álcool Etílico 70%, Dinâmica®, Brasil). Ambas as tíbias foram coletadas, a direita foi pesada, envolta em uma gaze com solução fisiológica 0,9% (Sanobiol®, Brasil) e congelada a -20 °C e posteriormente utilizada para realização do teste de flexão em três pontos e avaliação das massas ósseas. A tíbia esquerda, foi coletada e fixada em formalina tamponada a 10% por 48 horas, sendo transferida posteriormente para o álcool 70% (Álcool Etílico 70%, Dinâmica®, Brasil) até o início do seu processo de descalcificação, para posterior realização de análises histológica e histomorfométrica.

Índice de adiposidade

Os valores obtidos durante a pesagem das gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal, foram necessários para o cálculo de índice de adiposidade, parâmetro utilizado para confirmação da não obesidade entre os animais. O índice de adiposidade foi calculado a partir da somatória das massas de cada uma das gorduras dividido pelo valor da massa corporal (peso) do rato (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Teste de flexão em três pontos

Para avaliação da resistência óssea, as tíbias foram submetidas ao ensaio mecânico denominado teste de flexão em três pontos. As tíbias direitas, foram descongeladas por imersão em água à temperatura ambiente por 2 horas.

Os ossos foram posicionados na máquina universal de ensaios (EMIC DL-3000®, EMIC, Brasil) para a realização do teste de flexão em três pontos, com a lesão voltada para baixo. O aparelho foi programado na velocidade de 2 mm/min, distância de apoio de 20 mm e pré-carga

de 20 gramas. Obteve-se os seguintes dados: força máxima de compressão, módulo de elasticidade e deformação máxima da tibia (Figura 3).

Para calcular o valor do módulo de elasticidade foi necessário obter primeiro os valores das variáveis de força máxima e deformação até falha. Calculou-se então o módulo de elasticidade pela equação força máxima/deformação.

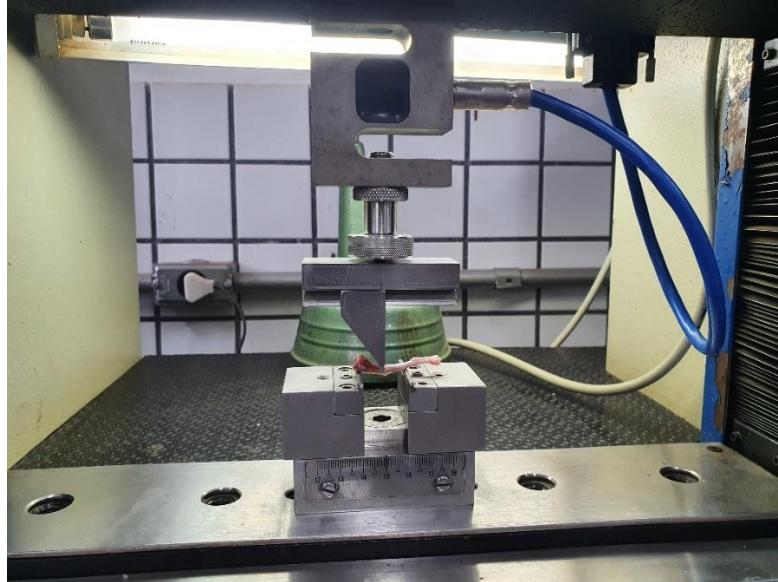


Figura 3 – Imagem do teste de flexão em três pontos em tibia de rato Wistar para determinação de força máxima de compressão, módulo de elasticidade e deformação máxima da tibia. Observar o posicionamento do osso com a lesão voltada para baixo.

Após todo o processo, as tíbias foram novamente armazenadas, congeladas para posterior avaliação da composição das massas ósseas.

Avaliação da composição óssea

Massa óssea total

A massa óssea total foi determinada por meio do processo de pesagem das tíbias direitas após descongelamento total das mesmas, por imersão em água à temperatura ambiente por um período de 2 horas. As tíbias foram secas em papel toalha e pesadas em balança de alta precisão (Gehaka BK 600[®], Gehaka, Brasil).

Massa óssea orgânica

Após a pesagem das tíbias, as amostras foram colocadas em crisol, separadamente, identificadas e colocadas em estufa de secagem (NI-1510D[®], Novainstruments, Brasil) 100° C por 24 horas, levando à desidratação do osso. Após esse processo, os ossos foram submetidos

a nova pesagem em balança de alta precisão e o valor da massa orgânica foi obtido pela diferença entre a massa seca e a massa mineral.

Massa óssea mineral

Após o processo de desidratação na estufa, as amostras foram calcinadas em mufla (Q318M[®], Quimis, Brasil) à 800°C por 24 horas, tendo por objetivo a eliminação de todo o material orgânico para determinação do conteúdo mineral. Feito isso, realizou-se novamente pesagem das amostras em balança de alta precisão.

Após todo esse processo, as amostras foram maceradas, pesadas, armazenadas em microtubos (do tipo *Ependorffe*) e identificadas para utilização em estudos futuros.

Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo

Descalcificação óssea

As tíbias esquerdas armazenadas em álcool 70%, (Álcool Etílico 70%, Dinâmica[®], Brasil) foram removidas do álcool 70% e transferidas para potes contendo solução de EDTA 4,13 % (EDTA[®], Synth, Brasil) pH 7,4, a fim de realizar a desmineralização óssea (Anexo 3). O processo de descalcificação levou 90 dias. A solução descalcificadora, foi trocada a cada 48 horas até completa desmineralização do osso. Foram utilizados potes de 750 ml, nos quais as amostras foram envoltas em gazes, presas e suspensas com auxílio de barbante. As amostras foram imersas em 500 ml da solução descalcificadora e o armazenamento destes potes foi realizado em geladeira com temperatura de 4°C.

Corte das amostras

Após a completa descalcificação, os ossos foram avaliados macroscopicamente para localização da lesão óssea monocortical e foi realizado um corte transversal sobre a região da lesão. Nos ossos do grupo controle, realizou-se um corte transversal a 8 mm da articulação femorotibiopatelar. As amostras obtidas foram armazenadas em cassetes, imersos em solução de PBS 0,15 molar (Tampão Fosfato Salino) até a retomada do seu processamento (Anexo 4).

Desidratação e Diafanização

As amostras de tíbias imersas em PBS 0,5 molar foram encaminhados ao laboratório de histopatologia da Universidade de Uberaba para realização do processo de desidratação e diafanização (ou claramento). Inicialmente foi realizado a lavagem das amostras com água corrente, por 10 minutos em uma cuba de vidro. Após a lavagem, na segunda etapa, as amostras foram retiradas da água corrente e imersas em soluções de álcool, afim de retirar toda a água presente no tecido (desidratação da amostra). Nesse processo, as amostras da cuba de vidro foram imersas primeiramente em álcool 95 % sendo aquecida no microondas na potência 20 por 9 minutos, para otimizar o processo. Em seguida, repetiu-se o mesmo processo com álcool absoluto quatro vezes consecutivas (por 9 minutos cada).

Retirou-se as amostras da cuba de vidro e as mesmas foram transferidas para a capela sendo colocadas um pote contendo álcool xilol (1:1), ficando por um período de 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram imersas em solução de xilol puro por 30 minutos três vezes consecutivas (em três potes diferentes), no qual (cada pote) possuía a mesma concentração de xilol.

Inclusão em parafina

As amostras imersas em xilol, foram filtradas e posteriormente colocadas em um béquer com parafina, sendo levadas para estufa à 60° C por 1 hora. Posteriormente foi feita a montagem e identificação dos blocos de cada amostra.

Após a inclusão das amostras em parafina, as mesmas foram cortadas com o auxílio de um micrótomo (RM2145, Leica Biosystems®, Estados Unidos). Realizou-se cortes de aproximadamente 5 micrometros, os quais foram colocados em lâminas comuns, sendo posteriormente coradas com hematoxilina e eosina, para avaliação histológica e histomorfométrica por meio de microscopia óptica, de forma quantitativa e qualitativa.

Análise histológica e histomorfométrica das tíbias

As lâminas do tecido ósseo foram escaneadas em um *scanner* de lâminas (Aperio Scanscope AT, Leica Biosystems®, Alemanha) na Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia.

A análise histológica das lâminas do tecido ósseo consistiu na avaliação descritiva do processo de reparação óssea, realizada em um aumento de 200 vezes por meio do programa

Aperio Imagescope 12.1. Em seguida foi realizada a mensuração da área de matriz óssea em μm^2 , no aumento de setenta vezes, utilizando a ferramenta *polygon selection* do programa *Image J*.

Análise Estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casuliazado. A análise estatística foi realizada por meio do programa *GraphPad Prism 9.0* e para cada variável foram determinadas a média e desvio padrão. Realizou-se testes de normalidade Shapiro-wilk e Kolmogorov-smirnov. Os dados que tiveram distribuição normal foram comparados pelo teste T pareado para amostras dependentes e T não pareado para aquelas não dependentes. O teste T pareado foi utilizado na comparação entre pré-operatório e dia de avaliação enquanto o teste T não-pareado foi utilizado na comparação entre animais dos grupos placebo, undecilato e controle, dentro de cada tempo de avaliação. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (SAMPAIO, 2007).

RESULTADOS

Circunferência abdominal

A avaliação das circunferências abdominais dos ratos mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo de avaliação D28, em que os animais do grupo undecilato apresentaram menor circunferência abdominal do que os animais do grupo placebo (Tabela 1 e Figura 4). Quando comparado o valor da circunferência abdominal entre o pré-operatório e os dias de avaliação, os animais do grupo undecilato apresentaram maior circunferência abdominal ($p < 0,05$) no dia de avaliação 19 (Tabela 1 e figura 4) enquanto os animais do grupo placebo apresentaram maior circunferência abdominal ($p < 0,05$) nos dias D19 e D28.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão das circunferências abdominais de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D3	Pré	D3	Pré	D7	Pré	D7
16,93 ^A	16,64 ^{aA}	18,21 ^A	17,50 ^{aA}	18,36 ^A	18,89 ^{aA}	19,50 ^A	18,86 ^{aA}
(1,21)	(1,11)	(2,61)	(0,76)	(1,31)	(0,85)	(1,38)	(0,24)

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D19	Pré	D19	Pré	D28	Pré	D28
17,75 ^A	19,00 ^{aB}	17,50 ^A	18,64 ^{aB}	16,71 ^A	20,36 ^{aB}	18,57 ^A	19,36 ^{bA}
(0,82)	(0,82)	(0,76)	(0,90)	(1,29)	(1,03)	(1,31)	(0,63)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T pareado ($p < 0,05$). Comparação entre pré-operatório e dia de avaliação.

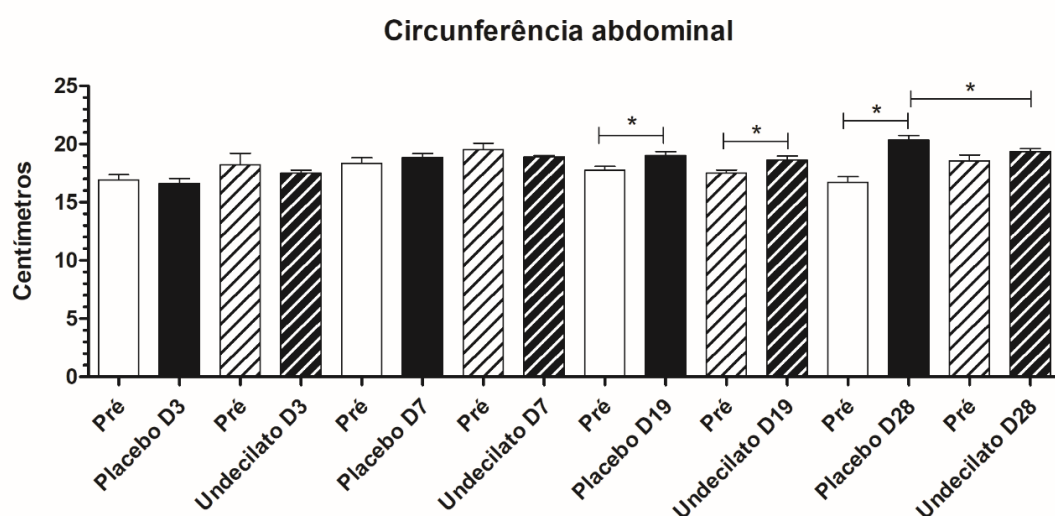


Figura 4 - Médias e desvios padrão da circunferência abdominal dos ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado (pré x tratamento) não pareado (placebo x undecilato) ($p < 0,05$).

Massa corporal

A avaliação da massa corporal mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) no dia de avaliação D28, em que os animais do grupo undecilato apresentaram massa corpórea mais elevada do que o grupo placebo. Quando comparado o valor da massa corporal entre o pré-operatório (pré) e dia de avaliação, tanto os animais do grupo placebo quanto do grupo undecilato, apresentaram maior massa corporal ($p < 0,05$) nos dias sete, 19 e 28 (Tabela 2 e figura 5).

Tabela 2 - Médias e desvios padrão das massas corporais de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D3	Pré	D3	Pré	D7	Pré	D7
352,90 ^A	357,90 ^{aA}	380,90 ^A	392,60 ^{aA}	380,40 ^A	397,90 ^{aB}	405,40 ^A	432,30 ^{aB}
(30,28)	(27,21)	(23,74)	(36,59)	(25,21)	(28,62)	(29,46)	(31,59)

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D19	Pré	D19	Pré	D28	Pré	D28
344,30 ^A	414,90 ^{aB}	339,30 ^A	392,30 ^{aB}	324,00 ^A	404,90 ^{aB}	373,30 ^A	451,70 ^{bB}
(25,62)	(20,50)	(12,98)	(24,81)	(17,27)	(11,81)	(32,79)	(19,12)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T pareado ($p < 0,05$). Comparação entre pré-operatório e dia de avaliação.

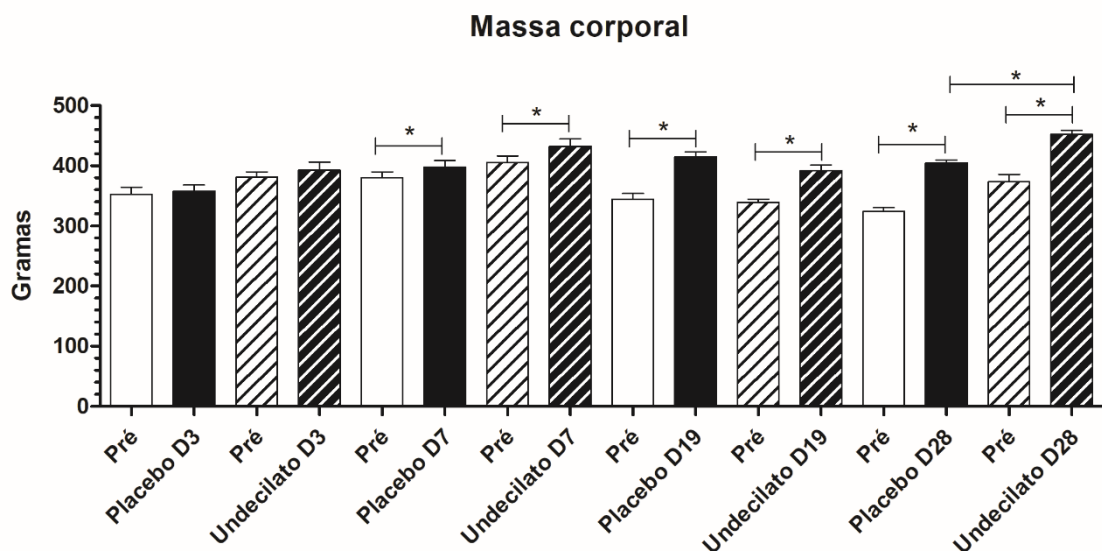


Figura 5 – Médias e desvios padrão da massa corporal dos ratos não obesos submetidos à osteotomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado (pré x tratamento) não pareado (placebo x undecilato) ($p < 0,05$).

Índice de massa corporal (IMC)

A avaliação do índice de massa corporal (IMC) mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) no dia de avaliação D7, em que os animais do grupo undecilato apresentaram maior IMC do que os animais do grupo placebo (Tabela 3 e Figura 6). Quando comparado os valores da massa corporal entre o pré-operatório (pré) e os dias de avaliação, observou-se

aumento significativo no IMC ($p<0,05$) no grupo placebo aos três, 19 e 28, e no grupo undecilato apenas aos 28 dias (Tabela 3 e Figura 6).

Tabela 3 - Médias e desvios padrão dos Índices de Massas Corporais (IMC) de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D3	Pré	D3	Pré	D7	Pré	D7
0,67 ^A	0,73 ^{aB}	0,82 ^A	0,74 ^{aA}	0,73 ^A	0,72 ^{aA}	0,80 ^A	0,80 ^{bA}
(0,06)	(0,07)	(0,22)	(0,03)	(0,06)	(0,04)	(0,07)	(0,04)
Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D19	Pré	D19	Pré	D28	Pré	D28
0,61 ^A	0,75 ^{aB}	0,74 ^A	0,77 ^{aA}	0,63 ^A	0,75 ^{aB}	0,65 ^A	0,75 ^{aB}
(0,05)	(0,05)	(0,07)	(0,07)	(0,04)	(0,04)	(0,04)	(0,06)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T pareado. ($p<0,05$). Comparação entre pré-operatório e dia de avaliação.

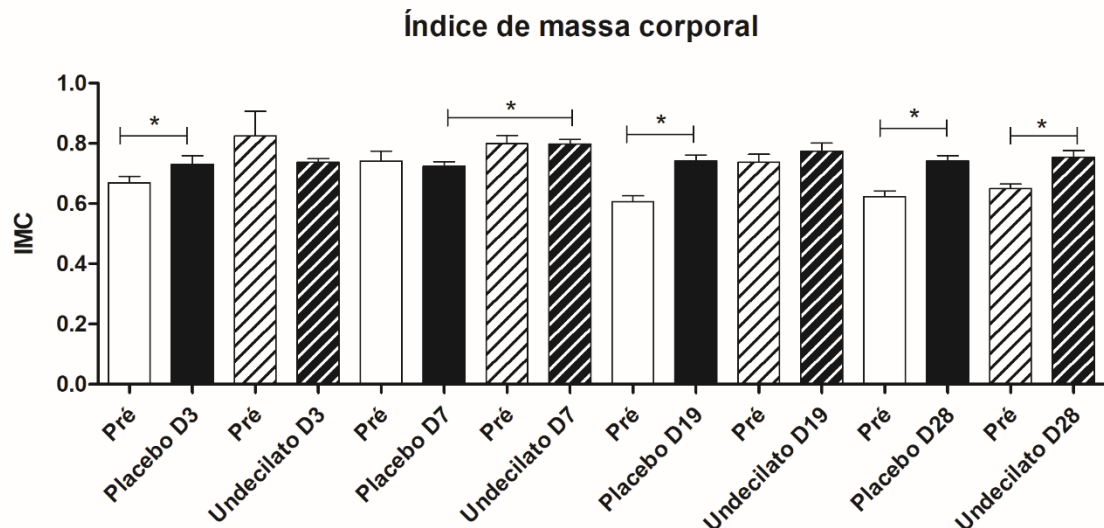


Figura 6 – Médias e desvios padrão do índice de massa corporal (IMC) dos ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado (pré x tratamento) e não pareado (placebo x undecilato) ($p<0,05$).

Massa do tecido adiposo visceral

Ao comparar o valor da massa do tecido adiposo visceral entre o grupo undecilato e grupo placebo, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) no dia sete de avaliação, de forma que os animais do grupo undecilato apresentaram maior valor de tecido adiposo visceral que os animais do grupo placebo (Tabela 4 e figura 7).

Tabela 4 - Médias e desvios padrão do tecido adiposo visceral de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

D3		D7		D19		D28	
Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
12,73 ^a	16,81 ^a	19,11 ^a	26,04 ^b	23,01 ^a	18,27 ^a	19,90 ^a	21,79 ^a
(1,90)	(4,59)	(4,77)	(3,28)	(6,07)	(2,94)	(0,98)	(4,13)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

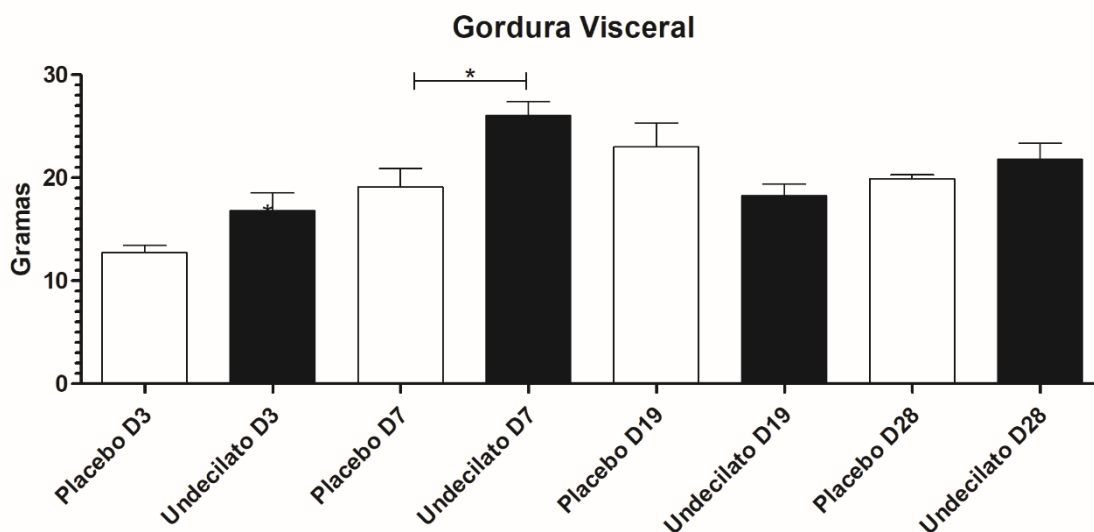


Figura 7 – Médias e desvios padrão da massa do tecido adiposo visceral entre ratos não obesos submetidos à lesão óssea, tratados com placebo ou com undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Índice de adiposidade

Na avaliação do índice de adiposidade não houve diferença entre os grupos placebo e undecilato, em nenhum tempo de avaliação (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5 - Médias e desvios padrão dos Índices de Adiposidade de ratos não obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

D3		D7		D19		D28	
Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
3,55 ^a	4,24 ^a	4,79 ^a	5,51 ^a	5,51 ^a	4,69 ^a	5,10 ^a	4,84 ^a
(0,38)	(0,38)	(1,09)	(1,26)	(1,28)	(0,89)	(0,48)	(0,99)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

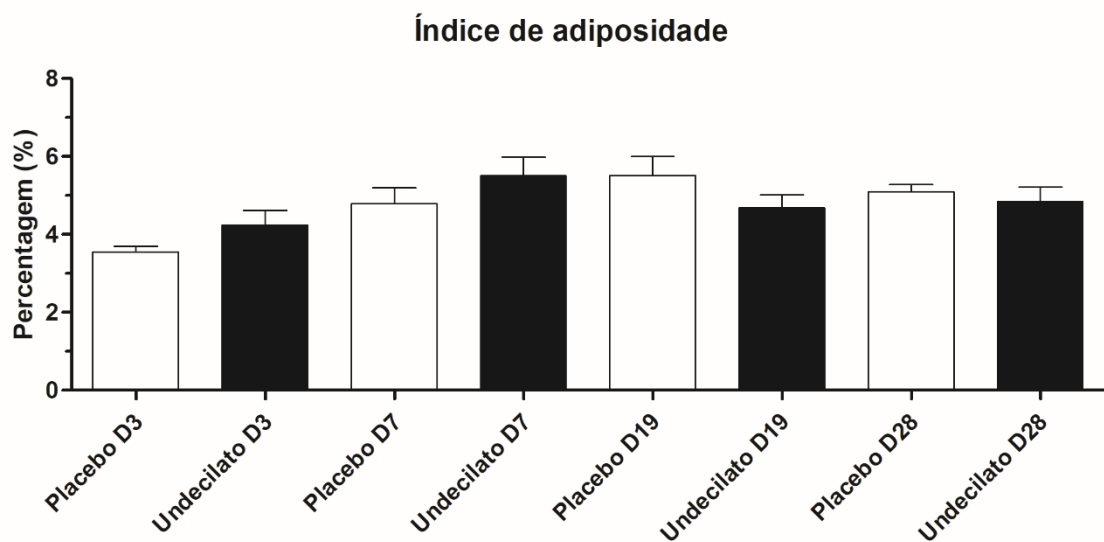


Figura 8 – Médias e desvios padrão do índice de adiposidade entre ratos não obesos submetidos à lesão óssea, tratados com placebo ou com undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Massa óssea total

O valor da massa óssea total não diferiu significativamente entre os animais do grupo placebo e grupo undecilato, em nenhum dos tempos de avaliação. Quando comparado o valor da massa óssea total entre os animais do grupo controle (sem lesão) com o grupo undecilato, constatou-se que os animais do grupo undecilato nos dias sete e 28 de avaliação apresentaram média significativamente ($p < 0,05$) maior em relação à massa óssea do que os animais do grupo controle (sem lesão) (Tabela 6 e Figura 9).

Tabela 6 - Médias e desvios padrão das massas ósseas totais de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à osteotomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
0,88 ^A	0,93 ^a	0,87 ^{aA}	0,96 ^a	1,00 ^{aB}	0,92 ^a	0,89 ^{aA}	0,90 ^a	1,00 ^{aB}
(0,04)	(0,12)	(0,10)	(0,09)	(0,08)	(0,06)	(0,05)	(0,11)	(0,12)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

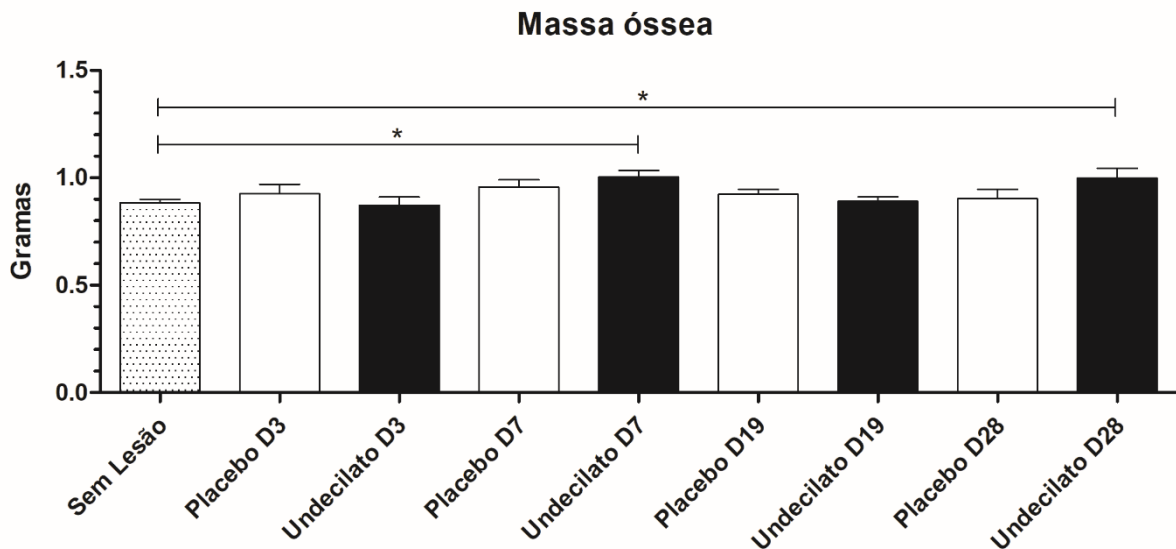


Figura 9 – Médias e desvios padrão das massas ósseas totais de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à osteotomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Massa óssea orgânica

A massa óssea orgânica foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo undecilato nos tempos de avaliação sete, 19 e 28 dias, quando comparado ao grupo placebo e aos três, sete e 19 dias, quando comparado ao grupo controle (sem lesão) (Tabela 7 e Figura 10).

Tabela 7 - Médias e desvios padrão das massas ósseas orgânicas de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à osteotomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
0,046 ^A	0,103 ^a	0,092 ^{aB}	0,044 ^a	0,107 ^{bB}	0,082 ^a	0,192 ^{bB}	0,031 ^a	0,050 ^{bA}
(0,021)	(0,034)	(0,039)	(0,005)	(0,033)	(0,042)	(0,036)	(0,009)	(0,016)

Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação

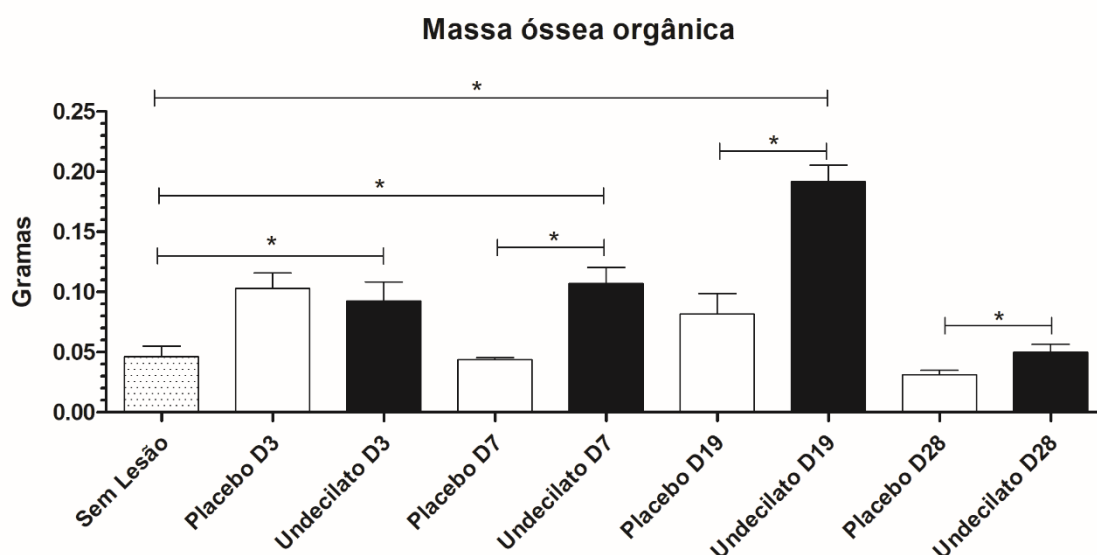


Figura 10 – Médias e desvios padrão das massas ósseas orgânicas de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à osteotomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Massa óssea mineral

Não houve diferença quando comparado o valor da massa óssea mineral dos animais do grupo undecilato com o grupo placebo. Aos 19 dias de avaliação, observou-se que os animais do grupo undecilato apresentaram menor massa óssea mineral ($p < 0,05$) quando comparados com os animais do grupo controle (sem lesão) (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 8 – Médias e desvios padrão da massa óssea mineral de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
0,24 ^A	0,23 ^a	0,25 ^{aA}	0,23 ^a	0,22 ^{aA}	0,22 ^a	0,19 ^{aB}	0,24 ^a	0,26 ^{aA}
(0,02)	(0,03)	(0,07)	(0,02)	(0,04)	(0,04)	(0,04)	(0,01)	(0,03)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

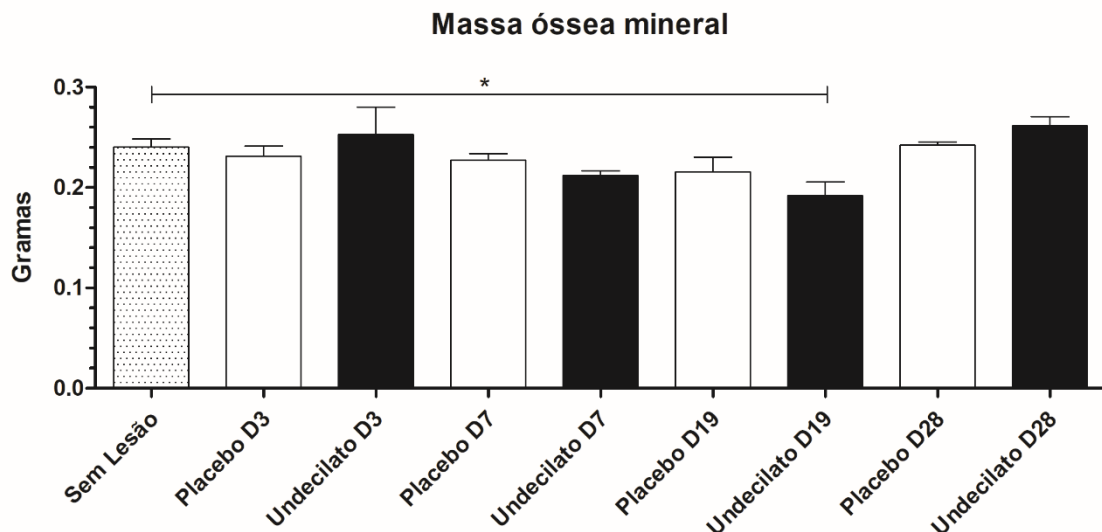


Figura 11 – Médias e desvios padrão da massa óssea mineral de tíbias de ratos não obesos controle ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Força máxima das tíbias

Não houve diferenças entre as médias de força máxima no teste de flexão das tíbias dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos avaliados. Foi observada força máxima significativamente ($p < 0,05$) inferior nos animais do grupo undecilato quando comparado com o o grupo controle (sem lesão), aos três, sete e 28 dias após a lesão (Tabela 9 e Figura 12).

Tabela 9 - Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à osteotomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Controle (D7)	D3		D7		D19		D28	
	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
115,2 ^A (10,75)	77,75 ^a (14,91)	86,85 ^{aB} (17,34)	91,96 ^a (17,01)	85,74 ^{aB} (15,69)	96,43 ^a (16,90)	103,5 ^{aA} (14,34)	84,53 ^a (10,45)	94,10 ^{aB} (10,58)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação

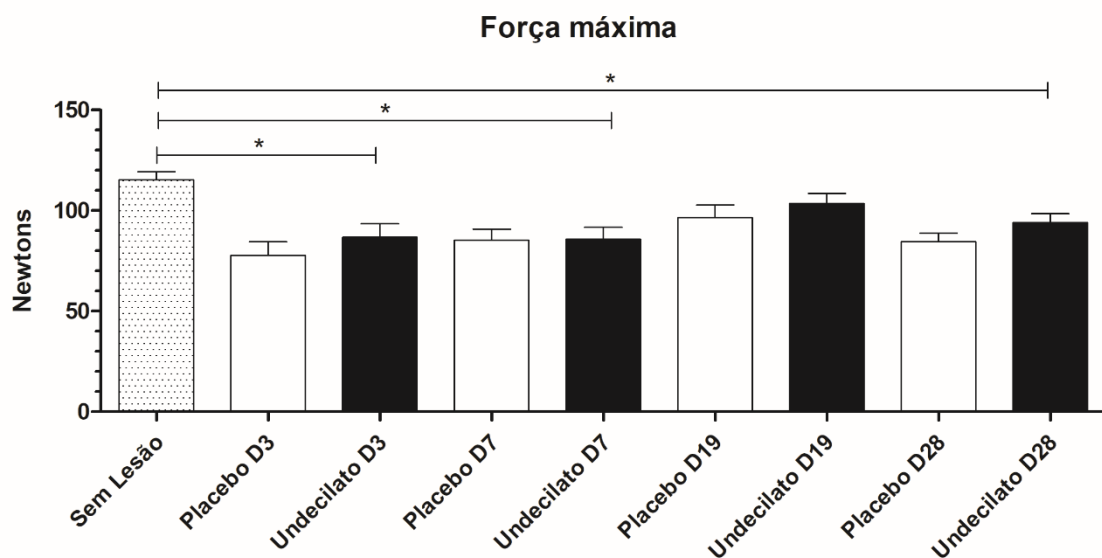


Figura 12 - Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à osteotomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Deformação até a falha das tíbias

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de deformação até a falha no teste de flexão, das tíbias dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos avaliados (Tabela 10 e Figura 13). Verificou-se significativa redução ($p < 0,05$) da deformação até a falha no teste de flexão, das tíbias dos animais dos grupos undecilato, quando comparados com os animais do grupo controle, em todos os tempos avaliados (Tabela 10 e Figura 13).

Tabela 10 - Média e desvio padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à osteotomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
1067,00 ^A	591,70 ^a	621,40 ^{aB}	620,00 ^a	540,00 ^{aB}	617,10 ^a	592,90 ^{aB}	558,60 ^a	582,90 ^{aB}
(451,10)	(65,55)	(86,49)	(182,80)	(81,45)	(124,60)	(123,20)	(101,20)	(91,96)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

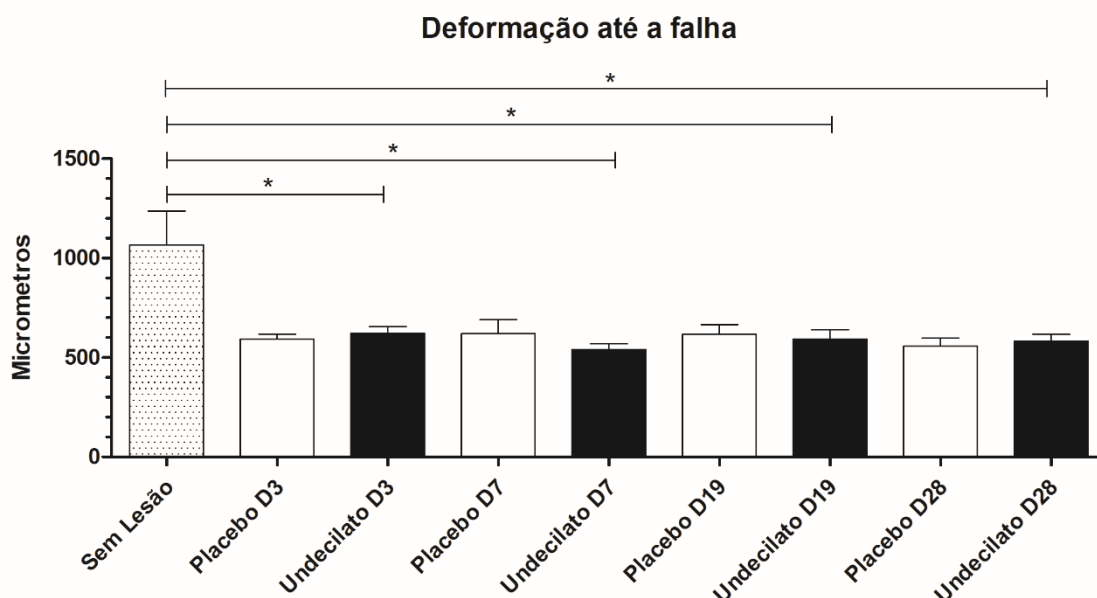


Figura 13 – Média e desvio padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à osteotomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Módulo de elasticidade

Não foram observadas diferenças significativas no módulo de elasticidade das tíbias entre os animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos de avaliação. Também não houveram diferença significativa entre o módulo de elasticidade das tíbias dos animais do grupo undecilato e dos animais do controle (Tabela 11 e figura 14).

Tabela 11 - Média e desvio padrão do módulo elasticidade (N/mm) de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, animais controle ou submetidos à osteotomia monocortical de tíbia proximal e ao

tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Controle (D7)	D3		D7		D19		D28	
	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
142,70 ^A	131,10 ^a	140,20 ^{aA}	143,40 ^a	162,30 ^{aA}	159,30 ^a	151,90 ^{aA}	146,70 ^a	153,60 ^{aA}
(20,48)	(11,02)	(22,34)	(29,31)	(38,94)	(28,65)	(15,01)	(20,85)	(27,17)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

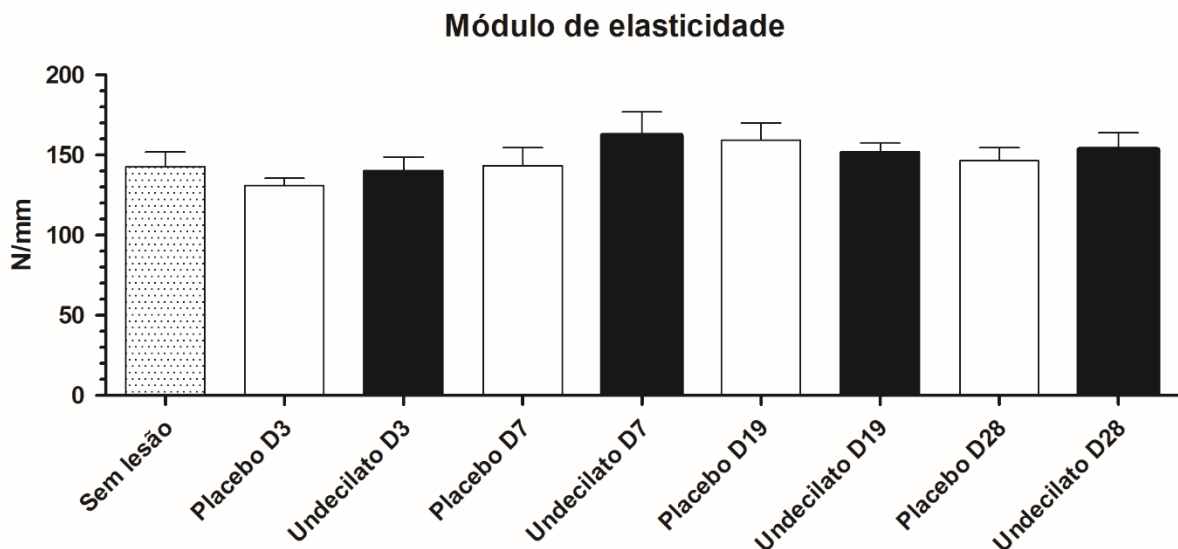


Figura 14 – Médias e desvios padrão do módulo de elasticidade de tíbias de ratos não obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos, dos animais controle ou submetidos à osteotomia monocortical de tíbia proximal e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo

Observou-se reparação óssea primária em ambos os grupos (Placebo e Undecilato). A reparação ocorreu de forma semelhante nos dois grupos, não sendo notadas diferenças significativas no processo de reparação. Aos três dias foi observado tecido de granulação em toda extensão do defeito ósseo. Aos sete dias, houve o preenchimento total do defeito por osso esponjoso saudável com trabéculas delgadas com lacunas predominantemente preenchidas por osteócitos ativos e recobertas por osteoblastos predominantemente fusiformes. Aos 19 dias após a lesão foi possível observar processo de remodelação óssea em estágio intermediário sendo o canal medular parcialmente preenchido por osso esponjoso com trabéculas mais espessas e por

tecido medular. Aos 28 dias, o processo de remodelação era um pouco mais avançado com canal medular predominantemente preenchido por tecido medular e poucas trabéculas ósseas espessas. A região correspondente ao defeito cortical estava totalmente preenchida por osso compacto, mas ainda em processo de remodelação (Figura 15).

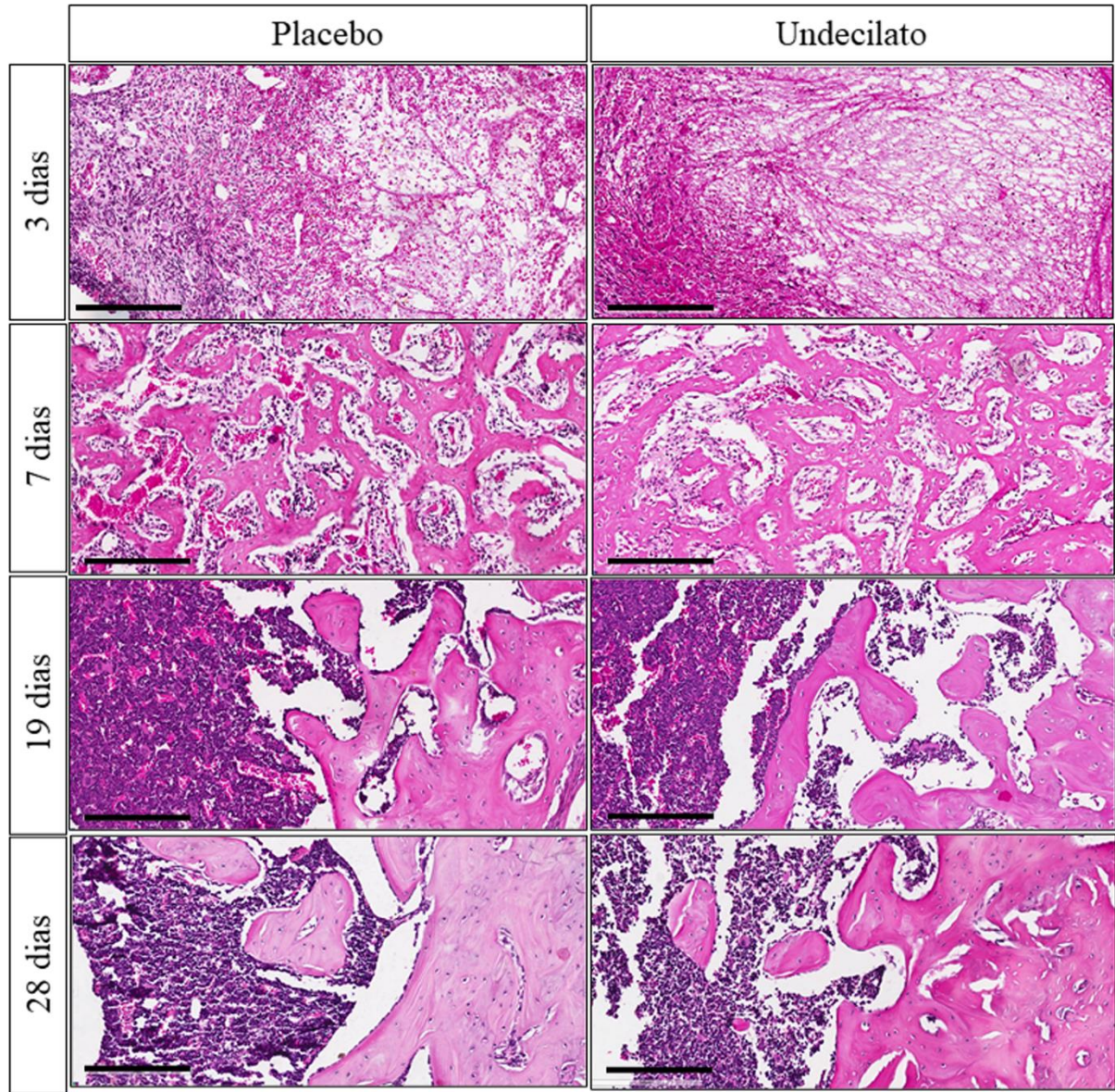


Figura 15 – Micrografia do osso neoformado em defeitos ósseos em tíbias de ratos não obesos, tratados com placebo ou undecilato e testosterona aos três, sete 19 e 28 dias após a lesão. Observar que a reparação óssea ocorreu por primeira intesão, que o osso neoformado aos sete dias é esponjoso e que o processo de remodelação se encontra avançado aos 28 dias. Hematoxilina eosina. Aumento de 20 x, Barra = 200µm

Não foram observadas diferenças significativas entre as áreas de tecido ósseo no foco de lesão dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos avaliados. Verificou-se área óssea significativamente maior ($p<0,05$) no grupo undecilato quando comparado aos animais controle (sem lesão), aos sete, 19 e 28 dias de avaliação.

Tabela 12 - Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias integras (controle) ou submetidas a osteotomia monocortical de ratos tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliação realizada aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
2,21 ^A	3,01 ^a	2,75 ^{aA}	3,10 ^a	3,89 ^{aB}	4,12 ^a	3,51 ^{aB}	3,59 ^a	3,61 ^{aB}
(0,75)	(1,45)	(0,47)	(0,64)	(0,79)	(1,05)	(0,41)	(0,63)	(0,33)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p<0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

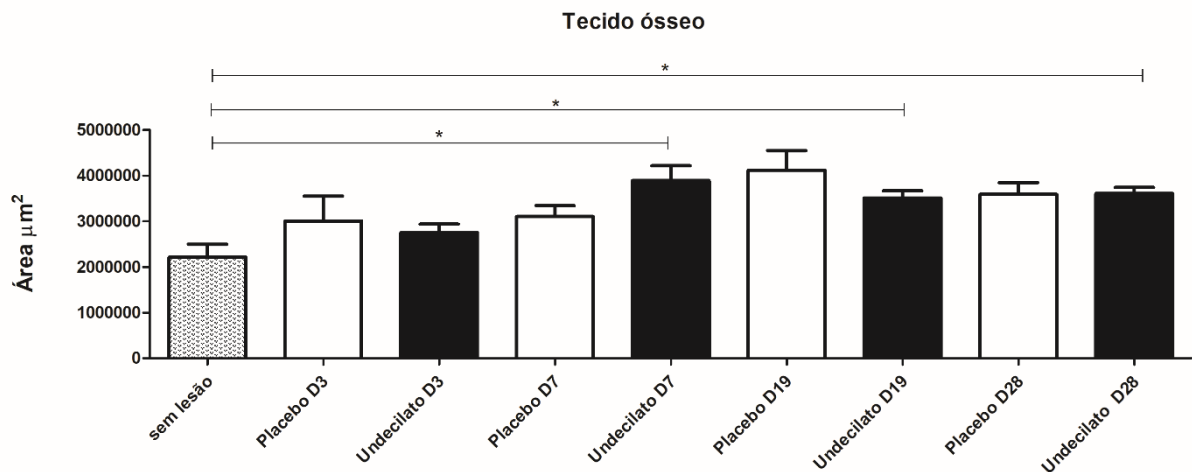


Figura 16 - Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias integras (controle) ou submetidas à osteotomia monocortical de ratos tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliação realizada aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

A escolha do undecilato de testosterona neste estudo, na dosagem de 8 mg/kg a cada sete dias (dose considerada suprafisiológica para ratos, segundo Kakarida *et al.*, 2017), embasou-se nas evidências encontradas na literatura, as quais relatam que o hormônio

testosterona pode exercer ação anabolizante no tecido ósseo (STUBBS, 1996; VANDENPUT *et al.*, 2004; KLEIN, 2014; GOLDS *et al.*, 2017), e que quando aplicado em doses suprafisiológicas pode ainda interferir no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, podendo ser favorável à reparação. Contudo, apesar do hormônio testosterona ser amplamente estudado, observou-se que os estudos acerca de um dos seus principais análogos, o undecilato de testosterona, são escassos, e que apesar de serem esperados resultados semelhantes a ação da testosterona no tecido ósseo e na massa corporal, ainda não existe um consenso de qual seria a influência desse fármaco nesses parâmetros. Visto isso, esperava-se então que com a aplicação do undecilato de testosterona, sendo este considerado como um dos melhores análogos da testosterona (HOHL *et al.*, 2009), nos animais do grupo undecilato deste estudo, submetidos à ostectomia monocortical tibial, que apresentassem maior reparação do tecido ósseo e que houvesse ainda aumento do osso como um todo, porém isso não foi observado.

Os resultados observados na avaliação histomorfométrica mostraram ausência de diferença entre os grupos undecilato e placebo, o que sugere que doses suprafisiológicas de andrógenos não favoreceram nesse caso a reparação do tecido ósseo, visto que o undecilato não conseguiu aumentar o osso como um todo. No estudo de Prakasam *et al.* (1999), por meio da análise da histomorfometria óssea, dos ratos orquiectomizados que receberam reposição de testosterona, foi possível observar que a aplicação de testosterona levou a neutralização completa do efeito de osteoporose que o osso estava sofrendo, além de ocorrer supressão da remodelação óssea. É importante lembrar que apesar do estudo de Prakasam *et al.* (1999) trabalhar com tíbias de ratos, os animais de seu experimento, eram orquiectomizados e apresentavam diminuição da concentração de testosterona basal. No presente estudo, os animais não eram orquiectomizados, e dessa forma supõe-se que ao receberem aplicações semanais de undecilato de testosterona, foram atingidas doses suprafisiológicas de testosterona no organismo, a qual afetou negativamente o aumento do osso como um todo.

A avaliação histológica confirmou que o processo de reparação óssea ocorreu de forma primária. Foi possível observar a fase inflamatória para reparação óssea no dia três, em todos os grupos. Essa fase é caracterizada histologicamente pela formação de tecido de granulação, presença de capilares neoformados, macrófagos e tecido conjuntivo. Essa fase inflamatória de reparação também pode ser observada no estudo de Gonçalves (2018), o qual avaliou a interferência da testosterona na formação do tecido de granulação de feridas cutâneas em ratos. Foi possível observar na avaliação histológica que após 7 dias (um pouco mais tardio do que no presente estudo), houve preenchimento da ferida cutânea de todos os grupos, por tecido de granulação, composto por infiltrado de células inflamatórias, fibroblastos e matriz extracelular.

No presente estudo, a formação de osso tarbecular em toda a área do defeito ósseo, observada aos sete, em ambos os grupos o mostra que a fase de reparação já havia se completado nesse tempo. O predomínio de lacunas ósseas mais alargadas, com mais osteócitos ativos, observadas no grupo undecilato indica processo de reabsorção óssea por osteólise osteocítica. As células ósseas observadas na histologia, participam do processo contínuo de renovação e remodelação do tecido ósseo, ocorrendo um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (COHEN, 2006). Os osteócitos mais ativos observados no grupo undecilato estão relacionados a uma maior reabsorção óssea e não se sabe exatamente o motivo, mas acredita-se em duas hipóteses. A primeira delas, é que por meio da administração de uma dose suprafisiológica de testosterona, possa ter ocorrido um feedback negativo no organismo, de forma que houve diminuição da produção de testosterona endógena, e com isso houve diminuição da concentração total de testosterona, interferindo então no processo de reparação. Com a diminuição dos níveis de andrógenos disponíveis, poderia ocorrer o aumento do tempo de vida de osteoclastos e favorecer a apoptose de osteoblastos, induzindo o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (MANOLAGAS *et al.*, 2002). A segunda hipótese, é que por meio da administração de doses suprafisiológicas de testosterona, o organismo do indivíduo atingiu uma dose muito alta de testosterona. Os animais do experimento não eram deficientes em testosterona, não eram orquiectomizados e já possuíam níveis fisiológicos (basais), então dessa forma, com excesso de testosterona, pode ter ocorrido interferência na ativação do receptor de andrógenos ou na estimulação dos receptores de estrógenos após aromatização, afetando a reparação. Porém, são apenas suposições, visto que não foi dosado a quantidade inicial (basal) e final de testosterona dos ratos do experimento. A reabsorção do osso esponjoso no canal medular observada nos dias 19 e 28, mostra que a reparação óssea já estava em processo avançado de remodelação, porém ainda incompleto. De forma geral, a histologia evidenciou que a utilização do undecilato de testosterona não levou a grandes alterações no processo de reparação óssea. Esperava-se que com a utilização de um análogo da testosterona, o grupo Undecilato apresentasse um maior efeito anabólico no osso do que grupo placebo, com maior estimulação de formação do osso cortical e esponjoso. Prakasam *et al.* (1999) e Wang *et al.* (2013) observaram em seus respectivos estudos, que por meio da administração exógena de testosterona em ratos orquiectomizados e humanos com osteoporose, respectivamente, houve melhora no processo de remodelação óssea, o que não foi observado no presente estudo. No estudo de Ahmad *et al.* (2013), observou-se com a utilização de nandrolona uma melhor cicatrização da fratura óssea dos coelhos do grupo experimental quando comparado com grupo controle, com trabéculas muito espessas e a formação de lamelas ósseas, tendo maior profilação osteoblástica.

Esperava-se que os animais do grupo undecilato apresentassem maior massa óssea total que os do grupo placebo, levando em consideração que alguns estudos mostram que o uso da testosterona favorece o anabolismo ósseo e consequentemente a síntese de tecido ósseo, aumentando a massa óssea total, em indivíduos com níveis diminuídos desse hormônio (PRAKASAM *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013). Embora não tenha sido observada maior massa óssea no grupo undecilato, é importante salientar, a massa óssea total foi medida no osso órgão, como um todo. Dessa forma, a avaliação de massa óssea total não representa apenas tecido ósseo, vale lembrar que mesmo no tempo de avaliação mais precoce (três dias) o defeito já havia sido preenchido com tecido de granulação e a massa desse tecido compôs a massa total do osso. No estudo de Prakasam *et al.* (1999), foi possível observar que por meio da reposição androgênica em ratos orquiectomizados, houve um aumento da massa óssea. A análise da histomorfometria óssea das tíbias dos animais mostravam inicialmente uma menor área de osso cortical bem como diminuição da formação periosteal nos animais orquiectomizados em relação aos animais intactos. Dessa forma, com a reposição de testosterona nos ratos orquiectomizados, neutralizou-se completamente o efeito de osteoporose cortical, além de suprimir a remodelação óssea e aumentar a massa e densidade óssea. No estudo de Wang *et al.* 2013, também foi possível observar anabolismo ósseo por meio da utilização de doses baixas de undecilato de testosterona, em humanos com osteoporose, sendo observada maior densidade da massa óssea da coluna lombar e do colo do fêmur, e ainda melhor remodelação óssea. Entretanto, apesar de ser o mesmo fármaco utilizado no presente estudo, deve-se levar em consideração que o fármaco foi utilizado por um tempo muito superior, totalizando 24 meses, além de que, os pacientes apresentavam deficiência de testosterona. Já o significativo aumento da massa óssea total nos animais do grupo undecilato em relação aos animais controle (sem lesão), observado aos sete e 28 dias, se deve a quantidade de osso neoformado para reparação do defeito. Os animais do grupo undecilato sofreram lesão óssea, e com isso, o osso ao ser lesionado iniciou o processo de reparação óssea primária, o qual há deposição direta de tecido ósseo no local da lesão, não havendo formação de calo (SCHINDELER *et al.*, 2008). Desta forma, a área de lesão foi preenchida com osso, consequentemente aumentando a massa óssea total. Além disso, o aumento da massa óssea total, pode estar relacionado também a uma reação do perióstio, a qual ocorreu em decorrência da irritação periosteal gerada durante o acesso à tíbia proximal. O perióstio exerce um papel importante na reparação óssea visto que sua camada mais interna possui osteoblastos, participando ativamente da osteogênese na injúria óssea (LOI *et al.*, 2016). Sabendo que os osteoblastos estão presentes no perióstio e que são as células ósseas que mais expressam

reatividade aos andrógenos (NOTELOVITZ, 2002), acreditava-se que o undecilato de testosterona iria agir nessas células, estimulando por meio do receptor de andrógeno, a síntese de matriz extracelular e o aumento da massa óssea total. Os animais do grupo controle (sem lesão), não necessitaram realizar o processo de reparação óssea, com produção de osso neoformado e nem desenvolveram reação periosteal, sendo então o canal medular composto apenas de tecido hematopoiético, apresentando uma menor massa óssea total que os animais do grupo undecilato.

O aumento de massa óssea orgânica observado nos animais do grupo undecilato em relação ao grupo placebo aos sete, 19 e 28 dias, mostra que o undecilato aumentou a massa de tecidos não mineralizados no osso como um todo, mostrando um efeito anabolizante nesse tecido. O aumento específico de massa óssea orgânica pode estar associado a reação periosteal (SCHINDELER *et al.*, 2008). O presente estudo sugere que o aumento de massa óssea orgânica do grupo undecilato se deve a uma maior reação periosteal, porém como o corte histológico do foco da lesão foi transversal, não foi possível avaliar até onde se estendeu a reação periosteal. Sugere-se ainda, que pode ter ocorrido maior produção de proteínas colágenas e não colágenas, aumentando a massa óssea orgânica, estimulada pela aplicação de undecilato de testosterona. Entretanto, apesar do aumento da massa óssea orgânica, isso não se converteu em uma maior deposição de tecido ósseo no foco de lesão e nem em fortalecimento mecânico do osso, o que era esperado, visto que a porção orgânica do osso é responsável por conferir uma maior ductibilidade óssea (CASTRO Jr. *et al.*, 2008). Já o aumento de massa óssea orgânica observado aos três, sete e 19 dias, do grupo undecilato quando comparado com o grupo controle, se deve a injúria óssea, de forma que os animais do grupo undecilato sofreram lesão óssea a qual levou a uma resposta inflamatória e à formação de tecido cicatricial no foco da lesão e em toda a região periosteal.

A menor massa óssea mineral observada aos 19 dias nos animais do grupo undecilato em comparação com o grupo controle, sugere que o undecilato possa ter alterado o metabolismo ósseo, de forma que os processos de reabsorção superaram os de deposição de matriz óssea. Evidências apontam que alterações dos níveis séricos dos andrógenos estão associados com um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014). Dessa forma, hipotetiza-se que não só as doses sub-fisiológicas, mas também doses altas de testosterona possam favorecer a reabsorção óssea induzindo a um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, prevalecendo a reabsorção. Salienta-se que essa é apenas uma suposição, visto que na literatura são escassos os estudos com aplicação de testosterona em indivíduos saudáveis. Entretanto, esperava-se, que os animais do grupo undecilato, apresentassem maior

mineralização óssea, quando comparado com grupo placebo ou controle, pois normalmente, os andrógenos, como a testosterona, aumentam a diferenciação de osteoblastos, estimulam a mineralização óssea e regulam a produção de matriz óssea (NOTELOVITZ, 2002). Ahmad *et al.* (2013) mostraram resultados favoráveis em seu estudo de fraturas tibiais em coelhos, que com aplicações de decanoato de nandrolona (outro análogo da testosterona), houve uma alta atividade osteoblástica e uma melhor mineralização óssea nos animais tratados com a testosterona.

Os resultados de força máxima e deformação até a falha das tíbias entre os grupos undecilato e placebo, evidenciaram que o undecilato de testosterona não interferiu significativamente na capacidade do osso de suportar carga e deformar, visto que ambos os grupos, suportaram da mesma forma a carga máxima e deformaram a mesma quantidade antes de fraturar. A menor força máxima do grupo undecilato em relação ao grupo controle (sem lesão) observada no dia três, justifica-se, pois os animais sofreram lesão óssea e consequentemente houve perda de tecido ósseo, interferindo na força máxima. Ainda no dia três, os animais estavam na fase inicial de reparação ossea, momento em que a osteogênese ainda não havia iniciado (Loi *et al.*, 2016) e com isso o osso apresentaria uma menor força. Já a menor força máxima e deformação até falha encontradas, no dia sete, nos animais undecilato quando comparado com controle (sem lesão) não era esperada, pois os animais do grupo undecilato apresentaram maior área de tecido ósseo. A explicação para esse fato pode estar relacionada ao tipo de osso formado nos animais do grupo undecilato que era esponjoso, com menor capacidade de sustentação de carga que o osso cortical presente nos animais do grupo controle (sem lesão). A menor força máxima e deformação até falha observadas nos animais do grupo undecilato, aos 19 e 28 dias, quando comparado ao grupo controle (sem lesão), também não era esperada visto que os ossos já estavam em fase avançada de reparação (fase de remodelamento). Uma possível explicação seria presença de alterações na matriz extracelular do osso neoformado que desfavoreceram o suporte de carga. No geral, os piores resultados mecânicos do grupo undecilato quando comparado com o grupo controle (sem lesão) estão diretamente relacionados a indução do defeito ósseo que além de reduzir a quantidade de osso para suporte de carga pode ter causado lesões no osso remanecente o fragilizando.

A não identificação de diferenças no módulo de elasticidade entre os grupos placebo, undecilato e controle, sugere que não houveram grandes alterações na composição do osso neoformado independentemente dos tratamentos. O módulo de elasticidade leva em consideração a resistência do osso à deformação, ou seja, quanto mais mineralizado o osso for, maior será a resistência à deformação elástica (FORESTIER-ZHANG; BISHOP, 2015). Os

resultados encontrados na avaliação do módulo de elasticidade estão de acordo com resultado da avaliação da massa óssea mineral que não diferiram na maioria dos tempos. Esperava-se que o animais do grupo undecilato apresentassem uma maior mineralização com consequente melhor desempenho nos testes mecânicos, mas isso não foi observado. Os dados na literatura em relação a influência da testosterona na resistência mecânica do osso de indivíduos saudáveis são escassos. Esses parâmetros, avaliados no teste mecânico estão relacionados a resistência e ductilidade do osso. Alguns estudos trazem que com a utilização da testosterona exógena em pacientes com osteoporose, condição a qual gera fragilidade óssea e os indivíduos apresentam perda de massa óssea, seria possível evitar perda da densidade e massa óssea e consequentemente o osso teria mais força (TURNER, 2002; FRISOLI et al., 2005; OLIVEIRA, 2010; GOLDS, 2017). Na literatura, ainda é bem descrito que geralmente o aumento de força óssea diante da utilização da testosterona e seus análogos, estaria correlacionado ao fármaco associado ao treinamento físico (CUNHA, 2012), o que não foi realizado nos aniamis do presente estudo. É fundamental destacar, que o presente estudo não utilizou grupo de animais com deficiência de testosterona ou com osteoporose, e que visamos observar se a dose suprafisiológica seria capaz de aumentar esses parâmetros. Entretanto um fator que não foi controlado é a possibilidade de um efeito rebote, visto que quando aplicada em grandes doses poderia levar à inibição da testosterona endógena. Clarke e Khosla (2009) em seu estudo, também hipotetizam a possibilidade de um efeito rebote ocasionado por aplicação de testosterona em altas doses, visto que a maioria dos estudos traz a utilização de doses suprafisiológicas de testosterona em animais que apresentam deficiência da mesma. Supõe-se que altas doses de andrógenos sintéticos podem ser prejudiciais aos ossos, devido à supressão da testosterona endógena (e estrogênio), e dessa forma terira sido útil a aferiação dos níveis de testosterona em animais durante o estudo.

Em relação a avaliação da massa corporal dos animais deste estudo submetidos à aplicação de undecilato de testosterona, já era esperado que a testosterona pudesse interferir nas medidas corporais dos animais, como já foi descrito por outros autores (HERBST; BHASIN, 2004; CARMO *et al.*, 2012), devido a sua atividade anabólica nos tecidos. Nesse estudo, foi observado, que embora os ratos já fossem adultos jovens, apresentando idade superior a 120 dias, o aumento de circunferência abdominal, massa corporal e IMC observados, mostram que independente da aplicação ou não de testosterona, os animais de todos os grupos continuaram crescendo durante o período experimental. Isso corrobora com os dados da literatura, visto que o crescimento esquelético de ratos Wistar termina em torno dos 140 dias (BOLAÑOS; DE ARRUDA, 2009) e o peso de um rato macho adulto pode atingir de 350 a 500 gramas (NEVES

et al., 2013). Desta forma, levando em consideração a idade dos animais e a duração do experimento, pode-se concluir que os animais no final no estudo ainda estavam em fase de crescimento esquelético e ganho de peso.

A menor circunferência abdominal observada especificamente aos 28 dias nos animais do grupo undecilato quando comparado ao grupo placebo, sugerem um metabolismo mais acelerado nos animais que receberam undecilato de testosterona. Os animais do grupo undecilato, aos 28 dias, receberam quatro aplicações do fármaco, e possivelmente sua dose suprafisiológica levou a um aumento do metabolismo, estando de acordo com o esperado, visto que a testosterona altera diretamente o metabolismo de lipídio (HERBST E BHASIN, 2004) podendo levar a uma redução da circunferência abdominal. Um estudo conduzido por Yassin *et al.*, 2014 também mostrou a eficiência da testosterona na redução de gordura corporal em humanos com hipogonadismo, após receberem administração do fármaco undecilato de testosterona (o mesmo utilizado no presente estudo), apresentaram diminuição da circunferência abdominal em até 8cm.

A maior massa corporal e IMC observados nos animais do grupo undecilato quando comparado com o grupo placebo aos 28 e sete dias, respectivamente, mostram que possivelmente houve efeito anabolizante do undecilato de testosterona. Dessa forma, supõe-se, que esse aumento de massa corporal e IMC observados no grupo undecilato estejam relacionados ao ganho de massa magra e muscular. Herbst e Bhasin (2004), observaram que doses suprafisiológicas de testosterona em mamíferos geram anabolismo, com consequente aumento de massa corporal magra e aumento de massa muscular. Carmo *et al.* (2012), descreveram que na espécie humana, pode ser observado aumento de dois a cinco quilogramas no peso corporal, estando diretamente relacionado ao aumento de massa magra e tamanho muscular. No presente estudo, também foi observado aumento de massa corporal dos animais, porém proporcional a espécie, levando em consideração que o modelo experimental do presente estudo é uma espécie bem menor que a humana.

Embora tenha sido observado maior massa do tecido adiposo visceral no sétimo dia de avaliação no grupo undecilato ao comparar com o grupo placebo, isso não refletiu em um aumento no índice da adiposidade. Acredita-se que essa maior massa do tecido adiposo visceral esteja associada ao crescimento dos ratos uma vez que foi proporcional ao aumento de massa corporal, pois não alterou o índice de adiposidade. Entretanto, esperava-se uma redução tanto na massa do tecido adiposo visceral quanto no índice de adiposidade dos animais do grupo Undecilato. Em uma revisão sobre a influência testosterona na arteroesclerose, foram mostradas

evidências de uma correlação inversa entre os níveis séricos de testosterona com o índice de massa corporal, circunferência da cintura e quantidade de gordura visceral (ECKARDSTEIN e WU, 2003). Doses suprafisiológicas de testosterona e seus análogos geram em humanos, aumento do metabolismo, propiciando redução da taxa de gordura corporal levando ao emagrecimento (HERBST e BHASIN, 2004; CARMO *et al.*, 2012). No entanto existem outros fatores envolvidos no processo de emagrecimento e perda de gordura visceral, e apenas a administração de testosterona exógena pode não ser suficiente para levar a redução de gordura intra-abdominal como foi observado no presente estudo. Steffens *et al.* (2012) já haviam observado uma resposta semelhante ao estudarem o efeito de uma mistura de 4 análogos da testosterona em ratos.

De uma forma geral, o undecilato de testosterona induziu o anabolismo na massa corporal dos animais, sem reduzir a gordura visceral e ainda foi capaz de estimular produção de massa óssea orgânica e aumento da atividade do osteócito. Entretanto, o undecilato de testosterona não influenciou positivamente na produção de massa óssea total e mineral, e nem aumentou a área de tecido ósseo neoformado, não sendo também observado melhora na resistência óssea. É importante salientar que, a ausência de diferença significativa nos parâmetros avaliados entre os grupos placebo e undecilato, muitas vezes observada ao longo desse estudo, pode estar relacionado ao modelo de falha óssea utilizado nesse experimento, sendo uma falha óssea não crítica, e dessa forma as alterações entre os dois grupos não foram tão evidentes como esperado.

CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado, concluiu-se que o undecilato de testosterona foi capaz de induzir anabolismo na massa corporal dos animais, porém sem reduzir a gordura visceral, como era esperado. Pôde-se ainda concluir que, o undecilato de testosterona foi capaz de promover um efeito anabólico nos tecidos moles do osso como órgão, mas isso não se converteu em uma maior produção de osso como tecido.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; YUNUS, S.M.; AGGHAR, A. et al. Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits - a study on experimental model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.1, p.93-96, 2013.
- ALSBERG, E.; ANDERSON, K.W.; ALBEIRUTI, A. **Engineering growing tissues**. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, v.99, n.19, p.12025-12030, sep. 2002.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. 2002.

BOLAÑOS, M.A.C; DE ARRUDA, M. Velocidade de crescimento a partir do peso corporal de ratos machos wistar. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.3, n.18, p.478-484, 2009.

BURIM, R.A. **Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar sob ação sistêmica de Icariin: estudo radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico**. 2013. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CADORE, E.L.; MICHEL, A.B.; KRUEL, L.F.M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.11, n.6, p. 373-9, 2005.

CARMO, E.C.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E.M. Esteróides anabolizantes: do atleta ao cardiopata. **Revista da Educação Física / UEM [online]**, v. 23, n. 2, pp. 307-318, 2012.

CASTRO, JR.A.F; CASTRO, B.K.; SILVEIRA, L.L.N. et al. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.27-32, 2008.

CHILLARÓN, J.J.; MIRO, M.F.; ALBAREDAS, M. et al. Testosterone undecanoate improves lipid profile in patients with type 1 diabetes and hypogonadotrophic hypogonadism. **Endocrine Journal**, v.63, n.9, p. 849-855, 2016.

CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Androgens and bone. **Steroids**, v.74, n.3, p.296–305, 2009.

COHEN, S. Role of RANK ligand in normal and pathologic bone remodeling and the therapeutic potential of novel inhibitory molecules in musculoskeletal diseases. **Arthritis Rheum.**, v.55, n.1, p.15-8, 2006.

CUNHA, F.V.M.; FILHO, O.F.M.; MOURA, F.S. et al., Efeito do exercício físico e da administração de testosterona na consolidação de fraturas de tíbia em ratos. **Fisioterapia em Movimento**., Curitiba, v. 25, n. 4, p. 777-784, 2012.

CUNHA, T.S.D.; CUNHA, N.S.; MOURA, M.J.C.S et al., Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n. 2, 2004

DINIZ, J.S. et al. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9/ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5.,2005. São José dos Campos. **Anais..** São Jose dos campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2005. P. 1364-8, 2005.

ECKARDSTEIN, A.V.; WU, F.C. Testosterone and atherosclerosis. **Growth Hormone & IGF Research**.Suppl A:S72-84, 2003.

FORESTIER-ZHANG, L.; BISHOP, N. Bone strength in children: understanding basic bone biomechanics. **Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition**, v. 101, n. 1, p. 2–7, 2015.

FRISOLI A, J.R.; CHAVES, P.H.; PINHEIRO, M.M. et al. The effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobin levels in elderly women with osteoporosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v.60, n.5, p.648-653, 2005.

GOLDS, G.; HOUDEK, D.; ARNASON, T. Male Hypogonadism and Osteoporosis: The Effects, Clinical Consequences, and Treatment of Testosterone Deficiency in Bone Health. **International Journal of Endocrinology**, p.1-15, 2017.

GONÇALVES, V.P. **Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea**, 2018. Tese (doutorado em odontologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara. 2018.

GUSMÃO, C.V.B.; PAULI, J.R.; ALVES, J.M. et al. **A influência do estímulo mecânico na expressão da quinase de adesão focal no osso in vivo**. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. v. 12, n. 3, 2007.

HERBST, K. L.; BHASIN, S. Testosterone action on skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.7, n.3, p. 271–277, 2004.

HOHL, A.; MARQUES, M.O.T.; CORAL, M.H.C. et al. Evaluation of late-onset hypogonadism (andropause) treatment using three different formulations of injectable testosterone. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.8, p.989-995, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: **Histologia Básica**. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.136–56, 2004.

KARAKIDA, L. M.; DE ARAUJO, C.M.; JOHANN, A.C.B.R. et al. Interaction of Anabolic Androgenic Steroids and Induced Tooth Movement in Rats. *Brazilian Dental Journal* [online]., v. 28, n. 4, p. 504-510, 2017.

KLEIN, P.; SCHELL, H.; STREITPARTH, F. et al. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. **Journal of Orthopaedic Research**. V.21, n.4, p.662-669, 2003.

LOI, F.; CÓRDOVA, L.A.; PAJARINEN, J.; LIN, T.H.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**. n.86, p.119-130, 2016.

MANOLAGAS, S.C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R.L. Sex steroids and bone. **Recent Progress Hormone Research**, v.57, p. 385-409, 2002.

NEVES, S. M. P.; PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Experimentação da FCF-IQ/USP**. Silvânia M. P. Neves (et al.) – São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and sterility**, v. 77, n. 4, p. 34-41, 2002.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, p.111-9, 2007.

OLIVEIRA, L.G; GUIMARÃES, M.L.R. **Osteoporose no homem**. Revista Brasileira de Ortopedia. V.45, n.5, p.392-396, 2010.

OLIVEIRA, M.C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by normocaloric – carbohydrate diet in mice, **Obesity**, 2012.

PRAKASAM, G.;YEH, J.K.; CHEN, M.M. et al. Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchietomized rats. **Bone**, 491-7, 1999.

SALAMERI, K. R.; OLSON, P. N.; BLOOMBERG, M. S. Elective gonadectomy in dogs: a review. **Journal of the american veterinary medical association.**, v. 198, n. 7, p. 1183-1192, 1991.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 3.ed., p.264, 2007.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P. et al. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Semin Cell Development Biol.**, v.108, n.1, p.5-13, 2008.

SOUZA, G.L.; HALLAK, J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. **BJU international**, v.108, n.11, p.1860-1865, 2011.

STEFFENS, J.P.; COIMBRA, L.S; RAMALHO-LUCAS, P.D. et al. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats--a radiographic and histologic pilot study. **Journal Periodontol**, v. 83, n.11, p. 1432-1439, 2012.

STUBBS, W.P.; BLOOMBERG, M.S.; SCRUGGS, S.L. et al. Effects of prepubertal gonadectomy on physical and behavioral development in cats, **Journal of the american veterinary medical association**, v. 209, n.11, p. 1864-1871, 1996.

TURNER, C. H. Biomechanics of Bone: Determinants of Skeletal Fragility and Bone Quality. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 2, p. 97–104, 2002.

VANDENPUT, L.; SWINNEN, J. V. et al. Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.19, n.9, p. 1462-1470, 2004.

VANDERSCHUEREN, D.; LAURENT, MR.; CLAESSENS, F.et al. Sex steroid actions in male bone. **Endocrine Reviews**, v.35, n.6, p. 906-60, 2014.

WANG, Y.J.; ZHAN, J.K; HUANG, W. et al. Effects of low-dose testosterone undecanoate treatment on bone mineral density and bone turnover markers in elderly male osteoporosis with low serum testosterone. **Internacional Journal of Endocrinology**. 2013.

WEN, X.H.; WANG, X.H.; TONG, J.S. et al. Reversible effect of testosterone undecanoate injection on spermatogenesis in rats. **Asian Journal of Andrology.**, v.2, n.3, 207-211, 2000.

YASSIN, D.J.; DOROS, G.; HaAMMERER, P.G. et al. Long-term testosterone treatment in elderly men with hypogonadism and erectile dysfunction reduces obesity parameters and improves metabolic syndrome and healthrelated quality of life. **The Journal of Sexual Medicine**, v.11, n.6, p. 1567-1576, 2014.

CAPÍTULO 3: Influência do undecilato de testosterona na massa corporal e na reparação óssea de ratos (*rattus norvegicus*) obesos

RESUMO

Objetivos: avaliar a eficiência do undecilato de testosterona na massa corporal e na reparação óssea de *Rattus norvegicus* obesos submetidos a cirurgia de indução de defeito ósseo monocortical em tibia. **Material e métodos:** 54 *Rattus norvegicus*, de linhagem Wistar, machos, com idade de 3 meses e peso médio inicial de 200 gramas, foram submetidos a um protocolo de indução de obesidade com dieta de alta palatabilidade por 60 dias e depois foram divididos em três grupos: placebo (n=24), undecilato (n=24) e controle (n=6). Os animais dos grupos placebo e undecilato foram submetidos à ostectomia óssea monocortical em suas tíbias e receberam aplicações semanais de placebo ou undecilato, enquanto os animais do grupo controle não foram submetidos à ostectomia e não foi realizada a aplicação de nenhum tratamento. Os animais dos grupos placebo e undecilato foram avaliados aos três dias, sete, 19 e aos 28 dias após lesão e os animais do grupo controle foram avaliados no dia sete. Foram coletados os dados de massa corporal, circunferência abdominal e comprimento nasoanal para à monitoração da massa corporal. Foram coletadas as gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal para realização do cálculo de índice de adiposidade. As tíbias direitas foram destinadas à avaliação por meio do teste de flexão em três pontos; avaliação da massa óssea total, mineral e orgânica; e avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo. **Resultados:** A avaliação de massa de tecido adiposo visceral e índice de adiposidade mostrou que não houve redução da gordura corporal dos animais do grupo undecilato. Houve menor massa óssea total no grupo undecilato em relação ao grupo placebo, maior massa óssea orgânica no dia sete quando comparado com o grupo controle (sem lesão) e menor massa óssea mineral quando comparado com os grupos placebo e sem lesão. A avaliação histológica mostrou reparação semelhante no grupo placebo e undecilato. A avaliação histomorfométrica evidenciou no dia de avaliação sete, menor área de tecido ósseo do grupo undecilato quando comparado com o grupo controle. No teste de flexão em três pontos os grupos undecilato e placebo não diferiram. **Conclusão:** Os animais do grupo undecilato apresentaram um discreto efeito anabólico, em tecidos moles, sem aumento na quantidade de osso neoformado em lesões ósseas e não houve redução da gordura visceral e índice de adiposidade nos animais obesos.

Palavras-chave: Regeneração óssea, ortopedia, hormônio esteroide, obesidade, tibia.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the efficiency of testosterone undecylate on body mass and bone repair in obese *Rattus norvegicus* undergone surgery to induce monocortical bone defect in the tibia.

Material and methods: 54 male *Rattus norvegicus*, Wistar strain, 3 month-old and average initial weight of 200 grams, were submitted to an obesity induction protocol with high palatability diet for 60 days and then divided into three groups: placebo (n=24), undecylate (n=24) and control (n=6). The animals in the placebo and undecylate groups were submitted to undergo tibial monocortical osteotomy and received weekly applications of placebo or undecylate and the animals in the control group were not submitted to osteotomy and no treatment was applied. The animals in the placebo and undecylate groups were evaluated at three, seven, 19 and 28 days after injury and the animals in the control group were evaluated on day seven. The animals were weighed and measured, and data on body mass, waist circumference and nasoanal length were collected and destined for monitoring body mass. Retroperitoneal, mesenteric and perennial fat were collected to calculate the adiposity index, which was used to exclude obese animals from the experiment. The right tibias were collected and destined for evaluation through the three-point flexural test; assessment of total, mineral and organic bone mass; and histological and histomorphometric evaluation of bone tissue.

Results: The evaluation of visceral adipose tissue mass and adiposity index showed that there was no reduction in body fat in the animals of the undecylate group. There was lower total bone mass in the undecylate group compared to the placebo group, higher organic bone mass on day seven when compared to the control (no lesion) group, and lower bone mineral mass when compared to the placebo and no lesion groups. The undecylate group had lower bone mineral mass when compared to the placebo and no lesion groups. Histological evaluation showed similar repair in the placebo and undecylate groups. Histomorphometric evaluation showed, on day seven, a smaller area of bone tissue in the undecylate group when compared to the control group. Ultimate strength, ultimate displacement and modulus of elasticity did not differ when compared the undecylate and placebo groups. **Conclusion:** There was a slight anabolic effect in soft tissues, with no increase in the amount of neoformed bone in bone lesions and there was no reduction in visceral fat and adiposity index in obese animals, as was expected.

Keywords: Bone regeneration, orthopedics, steroid hormone, obesity, tibia.

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença de origem multifatorial, cuja principal característica é o aumento significativo do tecido adiposo, sendo capaz de gerar ou agravar outros problemas de saúde (ZHAO, 2007). Ela pode estar relacionada à ocorrência de problemas ortopédicos por interferir no metabolismo osteoarticular (SCHWETZ *et al.*, 2012), pela sobrecarga de peso nos ossos e músculos (FRYE *et al.*, 2016) e por alterar o fluxo sanguíneo medular (BUDZIK *et al.*, 2017).

O efeito da obesidade sobre o sistema músculo esquelético é complexo envolvendo uma série de adipocinas e outras moléculas capazes de alterar a atividade das células envolvidas na regeneração osteocondral (SCHWETZ *et al.*, 2012). Os adipócitos e osteoblastos são derivados da mesma linhagem de células, portanto acredita-se que a obesidade pode promover a diferenciação da reserva de células tronco mesenquimais em adipócitos, deixando um número menor de células disponíveis para se realizar diferenciação osteoblástica, sendo esperado um efeito negativo na formação óssea (CAO, 2011).

Em contrapartida, diante da condição de obesidade, estudos mostram que a densidade óssea pode estar aumentada (ZHAO, 2007; SHILLS, 2009), tendo como base que o desenvolvimento e dinamismo do tecido ósseo sofre influência direta do aumento do peso, exigindo do esqueleto uma tensão maior em determinada região do corpo (SHILLS, 2009). Desta forma, é aceito que uma massa corporal maior impõe uma carga mecânica maior ao osso e que a massa óssea aumenta para acomodar a carga maior (ZHAO, 2007).

Os reflexos da obesidade podem ainda gerar acometimento da produção hormonal, de forma que os tecidos adiposos viscerais e subcutâneos são responsáveis pelo declínio da concentração de testosterona (NIELSEN *et al.*, 2007). A queda do nível de testosterona total diante da obesidade estaria ligada a menor disponibilidade de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) enquanto os mecanismos responsáveis pelo decréscimo da testosterona livre ainda não foram bem elucidados (LIMA *et al.*, 2000). Levando em consideração a baixa testosterona de indivíduos obesos, a aplicação exógena além de suprir essa necessidade, quando administrada em altas doses, seria ainda capaz de gerar redução da taxa de gordura corporal (HERBST e BHASIN, 2004).

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e no processo de reparação óssea de ratos obesos submetidos à ostectomia monocortical em tíbias.

MATERIAL E MÉTODOS

Normas éticas

O projeto de pesquisa foi conduzido conforme os princípios éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba – CEEA/UNIUBE, sob o protocolo do nº 028/2019. O projeto foi realizado no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba e nos laboratórios de Química, Histopatologia e Biologia Molecular e Celular da Universidade de Uberaba (Anexo 1).

Animais e descrição dos grupos

Foram utilizados 54 *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e peso médio inicial de 220 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba, os quais foram inseridos no biotério com atestado prévio de sanidade, sendo livres de patógenos. Foram alojados em caixas de 41 cm de comprimento, 34 cm de profundidade e 18 cm de altura com quatro animais cada, mantidos sob umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas e água *ad libitum*. Inicialmente, no período de adaptação de 15 dias, a alimentação se deu de forma *ad libitum* com ração comercial balanceada para roedores (Labina®, Presence, Brasil. Posteriormente os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais placebo, undecilato e controle (sem lesão) que serão detalhados a seguir. Iniciou-se então a indução de obesidade, que durou 60 dias, por meio de uma dieta de alta palatabilidade hipercalórica rica em carboidratos (adaptada de LACERDA et al., 2015). Os animais dos grupos placebo e undecilato foram submetidos a anestesia e cirurgia para indução de defeito ósseo (detalhados a seguir) e avaliados aos dias três, sete, 19 e 28 de pós-operatório, denominados como D3, D7, D19 e D28 respectivamente. Utilizou-se seis animais por tempo de avaliação. Os animais do grupo undecilato, receberam aplicações semanais de Undecilato de testosterona 250 mg/ml (Nebido®, Bayer, Brasil) na dose de 8 mg/kg (WEN et al., 2000) via subcutânea, enquanto os animais do grupo placebo receberam aplicações semanais de solução

fisiológica 0,9% (Sanobiol[®], Brasil) no volume de 0,01 ml/animal via subcutânea (Figura 1). Os animais controle não receberam aplicação de nenhum fármaco ou solução.

- ✓ Placebo: Animais submetidos à ostectomia proximal de tíbia com aplicação posterior de solução fisiológica, alimentados com dieta hipercalórica rica em carboidratos (n=24);
- ✓ Undecilato: Animais obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia com aplicação posterior de undecilato de testosterona, alimentados com dieta hipercalórica rica em carboidratos (n=24).
- ✓ Controle (Sem lesão): Animais que não foram submetidos à ostectomia proximal de tíbia, os quais foram alimentados com dieta hipercalórica rica em carboidratos (n=6).

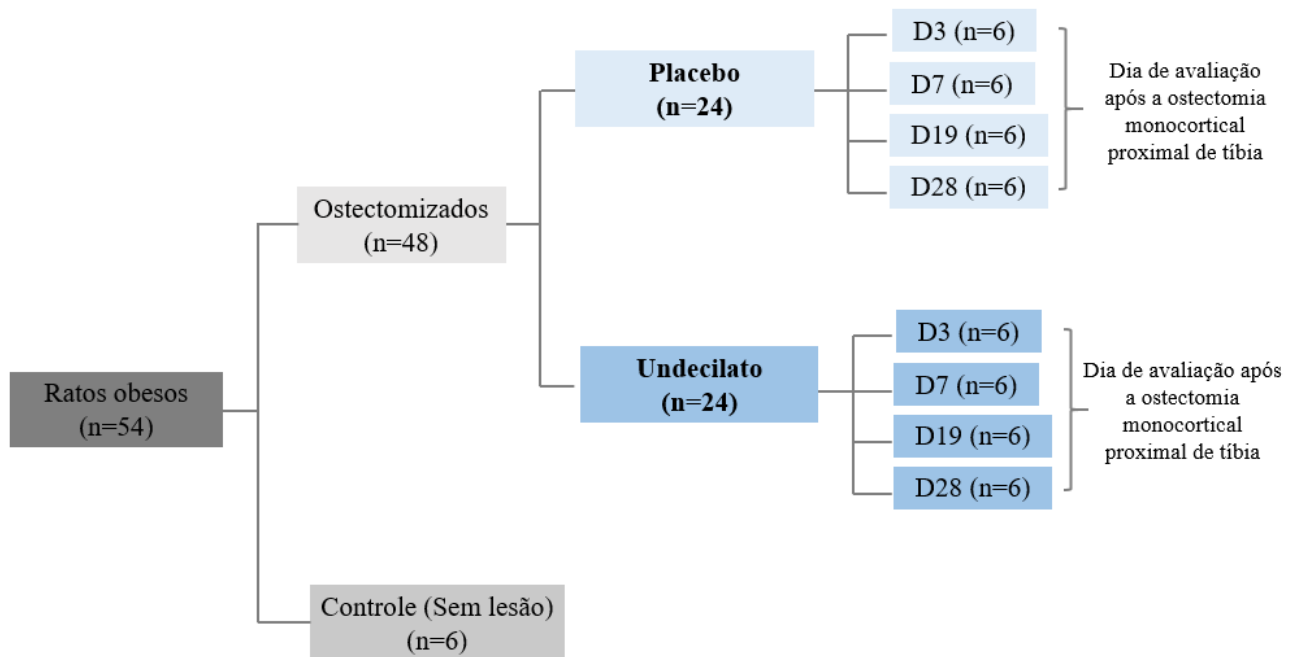


Figura 1 - Representação esquemática dos grupos experimentais obesos empregados no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Grupo placebo: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) com posterior aplicação de placebo; Grupo undecilato: realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) com posterior aplicação de undecilato de testosterona; e Controle: não realizada indução do defeito ósseo monocortical em tíbia (ostectomia) e sem aplicação de tratamento.

Indução da obesidade

A indução de obesidade nos animais dos grupos placebo, undecilato e controle (sem lesão) levou um período de 60 dias. Para indução da obesidade, instituiu-se a utilização de uma

dieta hipercalórica rica em carboidratos (LACERDA *et al.*, 2015), a qual foi fornecida aos animais também após a realização da indução do defeito ósseo. Essa dieta, composta por ração comercial triturada (Labina[®], Presence, Brasil), açúcar refinado (União[®], União, Brasil), leite condensado (Moça[®], Nestlé, Brasil) e água (Tabela 1), a qual foi preparada diariamente no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba. A transformação da ração comercial em pó foi feita por meio da trituração dos peletes, em um processador de alimentos (Skymesen PA-7[®], Skymesen, Brasil).

Estabeleceu-se a quantidade de dieta diária/rato de 37,5 gramas. Essa quantidade refere-se a mistura de água, leite condensado, açúcar e ração comercial, descritas na tabela 1. Esta mistura teve composição estimada de 3,59 kcal/g, 54,63% de carboidratos, 5,21% de lipídeos, 23,85% de proteínas, 7,94% de cinzas, 8,60% de umidade, 6,23% de fibras, 37,04 g/100g de sacarose, 1,4% de cálcio e 1,04% de fósforo (LACERDA *et al.*, 2015).

Diariamente realizava-se a preparação da ração, sendo todos os ingredientes pesados sempre na mesma balança de precisão e misturados na seguinte ordem: 4,125 gramas de açúcar refinado, correspondente a 11% da mistura total, dissolvido em 3,4 ml de água, o que corresponde a 9% da mistura de água, 15 gramas de leite condensado, correspondente a 40% da quantidade total e 15 gramas de ração comercial triturada, referente a 40 % da quantidade total. Após obtenção da mistura total, a mesma foi enrolada em forma de bolinhas, de tamanho uniforme e oferecidas frescas aos animais.

Tabela 1 - Relação de porcentagem dos ingredientes destinados à preparação da dieta hipercalórica utilizada para indução de obesidade em ratos Wistar submetidos à ostectomia monocortical em tíbias.

Ingredientes	Quantidade (%)
Açúcar refinado	11,00
Água	9,00
Ração comercial Labina triturada	40,00
Leite Condensado	40,00
Total	100,00

Monitoramento e avaliação do ganho de peso dos animais

Todos os animais foram pesados em uma balança de precisão de 0,5 gramas (C&F P-15[®], C&F Comércio e Serviços Eireli, Brasil) no início do experimento e posteriormente a cada sete dias, durante 60 dias (período referente à indução da obesidade) até o dia da indução da lesão. Depois disso, os animais foram pesados em cada tempo de avaliação (três, sete, 19 e 28 dias). Também foram mensurados a circunferência abdominal e comprimento nasoanal. Como critério de classificação do animal como animal obeso, foi utilizado o Índice de Massa Corporal, $IMC = \text{Peso (g)} / \text{comprimento nasoanal (cm}^2\text{)}$. Animais com o IMC acima de 0,68/cm² (NOVELLI *et al.*, 2007), foram considerados obesos e, portanto, considerados aptos para início do estudo.

O índice de adiposidade (IA) dos animais dos grupos placebo e undecilato foi obtido nos dias de avaliação três, sete, 19 e 28 dias após indução da lesão óssea e do grupo controle no sétimo dia após o início do estudo. O IA foi calculado partir da somatória das massas das gorduras perigonadal, mesenteria e retroperitoneal, dividido pelo valor da massa corporal total.

Indução de defeito ósseo (ostectomia) monocortical em tíbias

Para realização da indução de defeito ósseo monocortical nas tíbias dos ratos, os animais foram submetidos ao jejum hídrico e sólido de 12 horas antes do procedimento.

O protocolo anestésico utilizado foi morfina (Dimorf[®], Cristália, Brasil) na dose de 4 mg/kg via subcutânea (SC), seguido de aplicação de cetamina 10% (Cetamin[®], Syntec, Brasil)

na dose de 70 mg/kg via intraperitoneal (IP) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin[®], Syntec, Brasil) na dose de 4 mg/kg via IP. Logo em seguida, foi realizada uma tricotomia ampla de ambos os membros pélvicos e feita a aplicação de antibiótico enrofloxacina 10% (Kinetomax[®], Elanco, Brasil) na dose de 10 mg/kg via SC.

Já na sala cirúrgica, realizou-se a antisepsia de ambos os membros pélvicos do animal. Com o auxílio de gazes estéril, aplicou-se clorexidina degermante a 2% (Riohex[®], Rioquímica, Brasil) e clorexidina alcoólica 0,5% (Riohex[®], Rioquímica, Brasil), repetindo de forma intercalada três vezes cada um em ambos os membros.

Com os ratos em decúbito dorsal, o campo operatório foi delimitado por meio de campos cirúrgicos descartáveis de poliestireno (SMS, Soluções industriais, Brasil). O acesso a tibia foi feito por uma incisão longitudinal craniomedial à porção proximal da tibia, de aproximadamente 1,5 cm, e logo em seguida o tecido subcutâneo foi divulsionado até a exposição do periósteo (Figura 2 - A). Em seguida, foi realizado bloqueio anestésico local, instilando bupivacaína 0,5% (Neocaína[®], Cristália, Brasil) diluída a 0,05% em solução fisiológica estéril, na ferida cirúrgica, para realização do procedimento de perfuração. Com uma broca de 2 mm de diâmetro acoplada à uma furadeira com rotação controlada e autoclavável foi criado um defeito ósseo monocortical na face medial da porção proximal da tibia (Figura 2 - B). Em seguida, o defeito ósseo foi lavado (Figura 2 - C) com solução de Cloreto de Sódio 0,9% (Sanobiol[®], Brasil) para remoção de resquícios ósseos (Figura 2 - D). O espaço morto do subcutâneo foi reduzido em padrão simples contínuo, seguido por uma sutura subcuticular para aproximação de pele (Figura 2 - E) com nylon 4-0 (mononylon 4-0[®], Ethicon, Brasil). O mesmo procedimento foi realizado no membro contralateral.

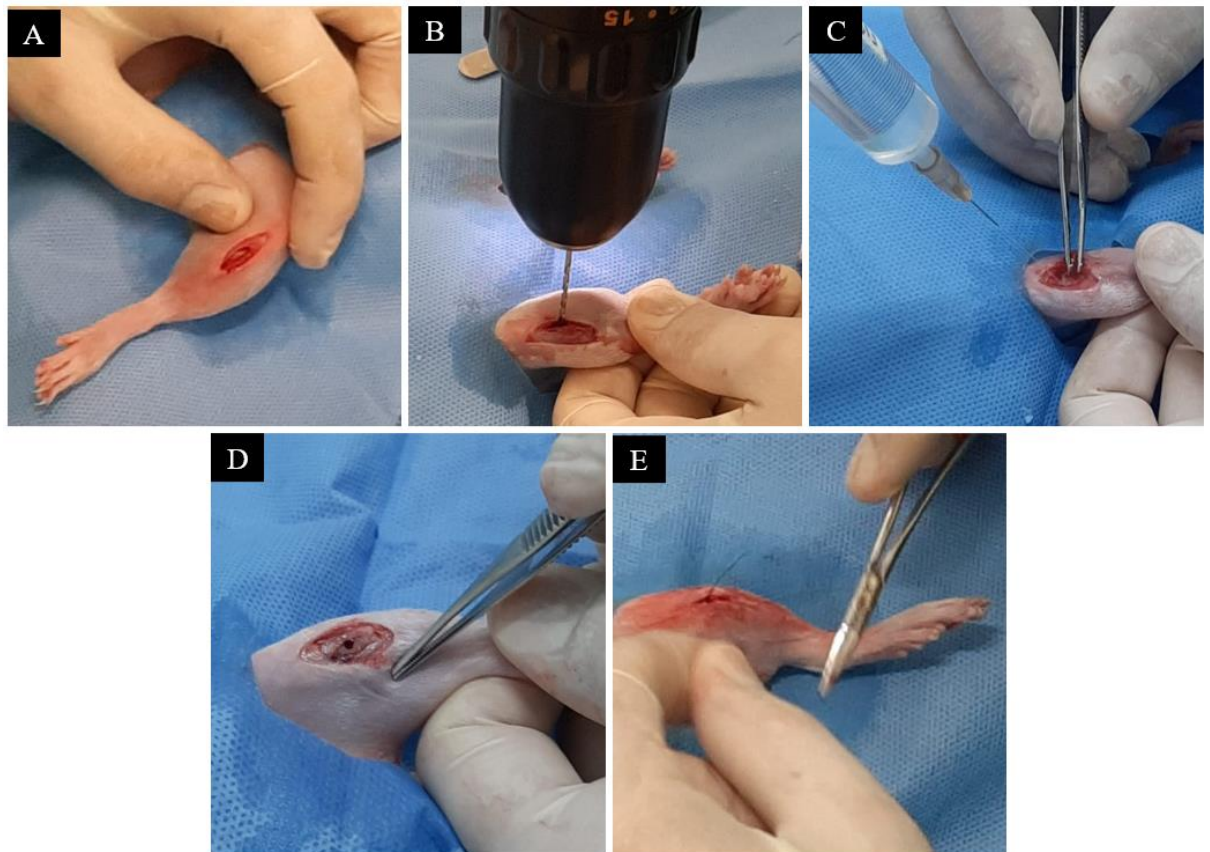


Figura 2 - Indução do defeito ósseo monocortical em tíbia de rato Wistar obeso empregado no estudo de avaliação do efeito do undecilato de testosterona na massa corporal e reparação óssea. Realizada uma incisão de pele craniomedial à região proximal de tíbia, de aproximadamente 1,5 cm, divulsão do tecido subcutâneo e exposição do periósteo (A). Defeito ósseo induzido com o auxílio de uma broca de 2 mm de diâmetro acoplada à uma furadeira ortopédica autoclavável (B). Lavagem do defeito ósseo com solução de Cloreto de Sódio 0,9% para remoção de resquícios ósseos (C e D). Abolição do espaço morto do subcutâneo em padrão simples contínuo, seguido por uma sutura subcuticular para aproximação de pele com nailon 4-0 (E).

Pós-operatório

Os animais foram mantidos em caixas e aquecidos com bolsas térmicas. O monitoramento dos animais foi realizado até sua completa recuperação anestésica quando realizou-se analgesia com Cloridrato de tramadol (Tramal[®], Pfizer, Brasil) 5 mg/kg SC no pós-operatório imediato, sendo repetida após 12 horas.

Aplicação dos Tratamentos

Ainda no pós-operatório imediato, os animais do grupo undecilato receberam aplicação de 8 mg/kg de Undecilato de Testosterona 250 mg/ml (Nebido[®], Bayer, Brasil) via subcutânea próximo à região inguinal, sendo aplicado no lado direito enquanto os animais do grupo placebo receberam 0,01 ml de solução fisiológica 0,9% (Sanobiol[®], Brasil), volume similar ao recebido

pelos animais do grupo undecilato. A aplicação do tratamento (undecilato e placebo) foi repetida a cada sete dias, sendo a aplicação da medicação realizada sempre no lado contralateral da última aplicação. Os animais referentes ao tempo de eutanásia D3 e D7, receberam apenas uma aplicação (no dia da cirurgia). Aqueles pertencentes ao D19 receberam 3 aplicações e os pertencentes ao D28, 4 aplicações de Undecilato de Testosterona. Os animais controle não receberam aplicação de nenhum tratamento.

Eutanásia e coleta de amostras

Como estabelecido previamente, seis animais de cada grupo (placebo e undecilato) foram submetidos a eutanásia nos dias três, sete, 19 e 28 após a osteotomia monocortical de tibia (denominados de D3, D7, D19 e D28). Os animais do controle foram submetidos à eutanásia no dia sete a contar do início das cirurgias dos outros animais.

Inicialmente, os animais foram submetidos à aprofundamento anestésico com cetamina (Cetamin[®], Syntec, Brasil) na dose de 180 mg/kg e xilazina (Xilazin[®], Syntec, Brasil) na dose de 30 mg/kg. Logo em seguida, os animais foram pesados e medidos, sendo coletados os dados massa, circunferência abdominal e comprimento nasoanal.

A partir do momento que o animal perdeu totalmente seus reflexos e o estímulo de sensibilidade dolorosa, foi iniciada a coleta das amostras. Realizou-se uma incisão abrindo a cavidade abdominal com o auxílio de uma tesoura, seguida de punção da veia cava até gerar choque hipovolêmico, o qual levou os animais à óbito. Posteriormente, realizou-se a coleta e pesagem das gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal para avaliação da massa adiposa e do índice de adiposidade. As gorduras foram lavadas em solução fisiológica, secadas com papel toalha, pesadas em balança de alta precisão de 0,005 gramas (Gehaka BK 600[®], Gehaka, Brasil) e fixadas em formalina tamponada a 10% (Anexo 2) por 48 horas e depois em álcool 70% (Álcool Etílico 70%, Dinâmica[®], Brasil). Ambas as tíbias foram coletadas, a direita foi pesada, envolta em uma gaze com solução fisiológica 0,9% (Sanobiol[®], Brasil) e congelada a -20 °C e posteriormente utilizada para realização do teste de flexão em três pontos e avaliação das massas ósseas. A tibia esquerda, foi coletada e fixada em formalina tamponada a 10% por 48 horas, sendo transferida posteriormente para o álcool 70% (Álcool Etílico 70%, Dinâmica[®], Brasil) até o início do seu processo de descalcificação, para posterior realização de histologia e histomorfometria.

Índice de adiposidade

Os valores obtidos durante a pesagem das gorduras mesentérica, retroperitoneal e perigonadal, foram necessários para o cálculo de índice de adiposidade, parâmetro utilizado para confirmação da obesidade entre os animais. O índice de adiposidade foi calculado a partir da somatória das massas de cada uma das gorduras dividido pelo valor da massa corporal (peso) do rato (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Teste de flexão em três pontos

Para avaliação da resistência óssea, as tíbias foram submetidas ao ensaio mecânico denominado teste de flexão em três pontos. As tíbias direitas, foram descongeladas por imersão em água à uma temperatura ambiente por um período de 2 horas.

Os ossos foram posicionados na máquina universal de ensaios (EMIC DL-3000[®], EMIC, Brasil) para a realização do teste de flexão em três pontos, com a lesão voltada para baixo. O aparelho foi programado na velocidade de 2 mm/min, distância de apoio de 20 mm e pré-carga de 20 gramas. Obteve-se os seguintes dados: força máxima de compressão, módulo de elasticidade e deformação máxima da tíbia (Figura 3).

Para calcular o valor do módulo de elasticidade foi necessário obter primeiro os valores das variáveis de força máxima e deformação até falha. Calculou-se então o módulo de elasticidade pela equação força máxima/deformação.

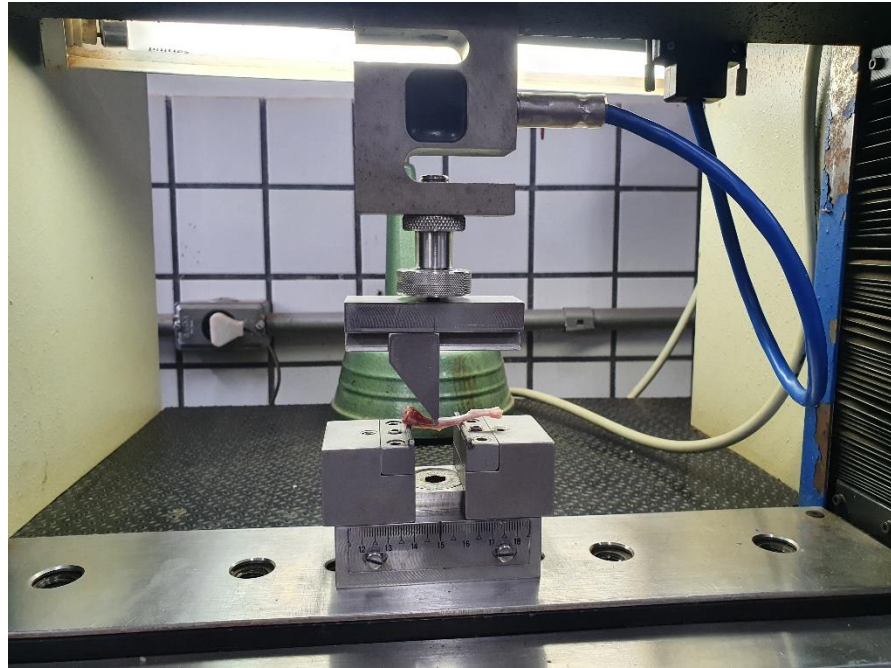


Figura 3 - Realização do teste de flexão em três pontos em tíbia de rato Wistar obeso para determinação de força máxima de compressão, módulo de elasticidade e deformação máxima da tíbia. Observar o posicionamento do osso com a lesão voltada para baixo.

Após todo o processo, as tíbias foram novamente armazenadas e congeladas para posterior avaliação da composição das massas ósseas.

Massa óssea total

A massa óssea total foi determinada por meio do processo de pesagem das tíbias direitas após descongelamento total das mesmas, por imersão em água à temperatura ambiente por um período de 2 horas. As tíbias foram secas em papel toalha, pesadas em balança de alta precisão (Gehaka BK 600[®], Gehaka, Brasil).

Massa óssea orgânica

Após a pesagem das tíbias, as amostras foram colocadas em crisol, separadamente, identificadas e colocadas em estufa de secagem (NI-1510D[®], Novainstruments, Brasil) 100° C por 24 horas, levando à desidratação do osso. Passadas por esse processo, os ossos foram submetidos à nova pesagem em balança de alta precisão e o valor da massa orgânica foi obtido pela diferença entre a massa seca e a massa mineral.

Massa óssea mineral

Após o processo de desidratação na estufa, as amostras foram calcinadas em mufla (Q318M[®], Quimis, Brasil) à 800°C por 24 horas, tendo por objetivo a eliminação de todo o material orgânico para determinação do conteúdo mineral. Feito isso, realizou-se novamente pesagem das amostras em uma balança de alta precisão.

Após todo esse processo, as amostras foram maceradas, pesadas, armazenadas em microtubos (do tipo *Ependorffe*) e identificadas para utilização em estudos futuros.

Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido ósseo

Descalcificação óssea

As tíbias esquerdas armazenadas em álcool 70%, (Álcool Etílico 70%[®], Dinâmica, Brasil) após 90 dias tiveram o início do seu processamento. As mesmas foram transferidas para potes contendo solução descalcificadora de EDTA 4,13 % (Synth[®], Brasil) pH 7,4, afim de realizar a desmineralização óssea (Anexo 3). O processo de descalcificação levou 90 dias. A solução descalcificadora, foi trocada a cada 48 horas até completa desmineralização do osso. As amostras foram imersas em 500 ml da solução descalcificadora e o armazenamento destes potes foi realizado em geladeira com temperatura à 4°C.

Corte das amostras

Após a completa descalcificação dos ossos, eles foram avaliados macroscopicamente para localização da lesão óssea monocortical e foi realizado um corte transversal sobre a região da lesão. Nos ossos do grupo controle, realizou-se um corte transversal a 8 mm da articulação femorotibiopatelar. As amostras obtidas foram armazenadas em cassetes, imersos em solução de PBS 0,15 molar (Tampão Fosfato Salino) até o seu processamento (Anexo 4).

Desidratação e diafanização

As amostras de tíbias imersas em PBS 0,5 molar, foram encaminhadas ao laboratório de histopatologia da Universidade de Uberaba para realização do processo de diafanização (ou claramento). O processo de diafanização se deu em três etapas. Inicialmente foi realizado a lavagem das amostras com água corrente, por 10 minutos em uma cuba de vidro. Após a lavagem, na segunda etapa, as amostras foram retiradas da água corrente e imersas em soluções de álcool, afim de retirar toda a água presente no tecido (desidratação da amostra). Nesse

processo, as amostras da cuba de vidro foram imersas primeiramente em álcool 95 % sendo aquecida no microondas na potência 20 por 9 minutos, para otimizar o processo. Em seguida, repetiu-se o mesmo processo com álcool absoluto quatro vezes consecutivas (por 9 minutos cada).

Retirou-se as amostras da cuba de vidro e foram transferidas para um pote contendo álcool xilol (1:1), ficando por um período de 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram imersas em solução de xilol puro por 30 minutos três vezes consecutivas, no qual os três potes possuíam a mesma concentração de xilol.

Inclusão em Parafina

As amostras imersas em xilol, foram filtradas e posteriormente colocadas em um béquer com parafina, sendo levadas para estufa à 60° C por 1 hora. Posteriormente foi feita a montagem dos blocos de cada amostra.

Após a inclusão das amostras em parafina, as mesmas foram cortadas com o auxílio de um micrótomo (RM2145[®], Leica Biosystems, Estados Unidos). Realizou-se cortes de aproximadamente 5 micrometros, os quais foram colocados em lâminas comuns, sendo posteriormente coradas com hematoxilina e eosina, para avaliação histológica e histomorfométrica por meio de microscopia óptica, de forma quantitativa e qualitativa.

Análise histológica e histomorfométrica das tíbias

As lâminas do tecido ósseo foram escaneadas em um *scanner* de lâminas (Aperio Scanscope AT, Leica Biosystems[®], Alemanha) na Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia.

A análise histológica das lâminas do tecido ósseo consistiu em uma avaliação descritiva do processo de reparação óssea, realizada em um aumento de 200 vezes por meio do programa *Aperio Imagescope* 12.1. Em seguida foi realizada a mensuração da área de matriz óssea em μm^2 , no aumento de setenta vezes, utilizando a ferramenta *polygon selection* do programa *Image J*.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 9.0 e para cada variável foram determinadas a média e desvio padrão. Realizou-se testes de normalidade Shapiro-wilk e Kolmogorov-smirnov. Os dados que tiveram distribuição normais foram

comparados pelo teste T pareado para amostras dependentes e T não pareado para aquelas não dependentes. O teste T pareado foi utilizado na comparação entre pré-operatório e dia de avaliação enquanto o teste T não-pareado foi utilizado na comparação entre animais dos grupos placebo, undecilato e controle, dentro de cada tempo de avaliação. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (SAMPAIO, 2007).

RESULTADOS

Circunferência abdominal

Não houve diferença significativa nas circunferências abdominais dos animais dos grupos undecilato e placebo em nenhum dos tempos avaliados. Quando comparado com o pré-operatório (pré), observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da circunferência abdominal nos animais do grupo undecilato, no terceiro dia de avaliação, e do grupo placebo, no 28º dia. Também foi identificada significativa ($p < 0,05$) redução na circunferência abdominal dos animais do grupo placebo no terceiro dia de avaliação (Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2 - Médias e desvios padrão das circunferências abdominais de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D3	Pré	D3	Pré	D7	Pré	D7
21,44 ^A	20,28 ^{aB}	19,88 ^A	20,94 ^{aB}	20,86 ^A	20,36 ^{aA}	20,25 ^A	20,63 ^{aA}
(1,65)	(1,06)	(0,64)	(0,90)	(1,77)	(1,38)	(2,20)	(0,77)
Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D19	Pré	D19	Pré	D28	Pré	D28
20,86 ^A	21,64 ^{aA}	20,56 ^A	21,00 ^{aA}	20,19 ^A	22,44 ^{aB}	20,14 ^A	21,00 ^{aA}
(0,85)	(1,22)	(0,77)	(1,12)	(1,25)	(1,27)	(1,18)	(1,38)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T pareado. ($p < 0,05$). Comparação entre pré-operatório e dia de avaliação.

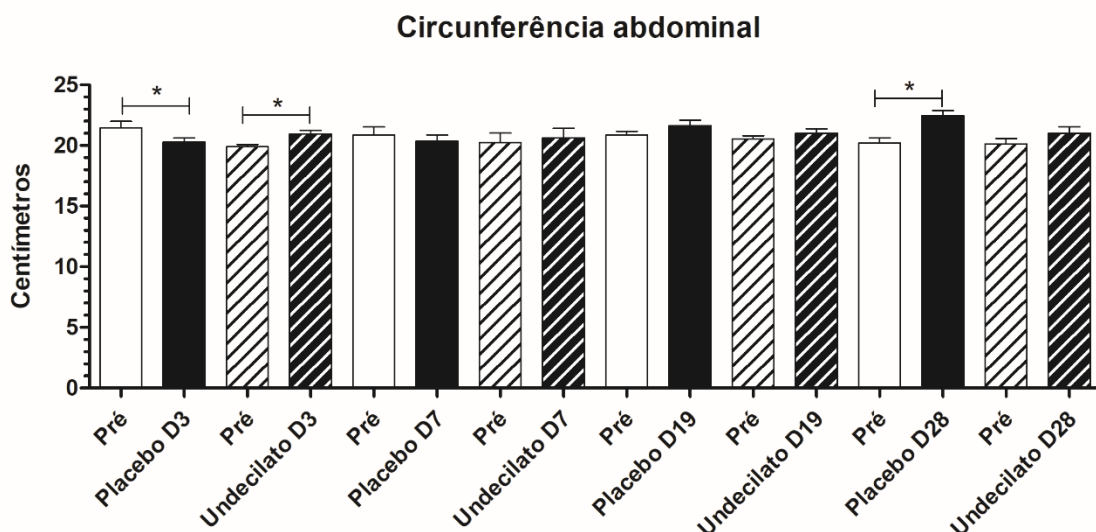


Figura 4 - Médias e desvios padrão das circunferências abdominais de ratos obesos submetidos à osteotomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Massa corporal

Não houve diferença significativa nas massas corporais dos animais dos grupos undecilato e placebo em nenhum dos tempos avaliados. Quando comparado com o pré-operatório (pré), observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da massa corporal dos animais de ambos os grupos aos 19 e 28 dias de avaliação (Tabela 3 e Figura 5).

Tabela 3 - Médias e desvios padrão da massa corporal de ratos obesos submetidos à osteotomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D3	Pré	D3	Pré	D7	Pré	D7
466,60 ^A	469,30 ^{aA}	459,00 ^A	463,10 ^{aA}	465,30 ^A	473,00 ^{aA}	460,00 ^A	464,10 ^{aA}
(28,85)	(31,02)	(33,43)	(37,50)	(31,99)	(35,76)	(59,49)	(60,78)
Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D19	Pré	D19	Pré	D28	Pré	D28
461,60 ^A	504,90 ^{aB}	457,90 ^A	484,40 ^{aB}	459,10 ^A	512,00 ^{aB}	440,20 ^A	515,30 ^{aB}
(23,42)	(25,18)	(32,59)	(32,68)	(47,77)	(46,86)	(36,31)	(40,50)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T pareado. ($p < 0,05$). Comparação entre pré-operatório e dia de avaliação.

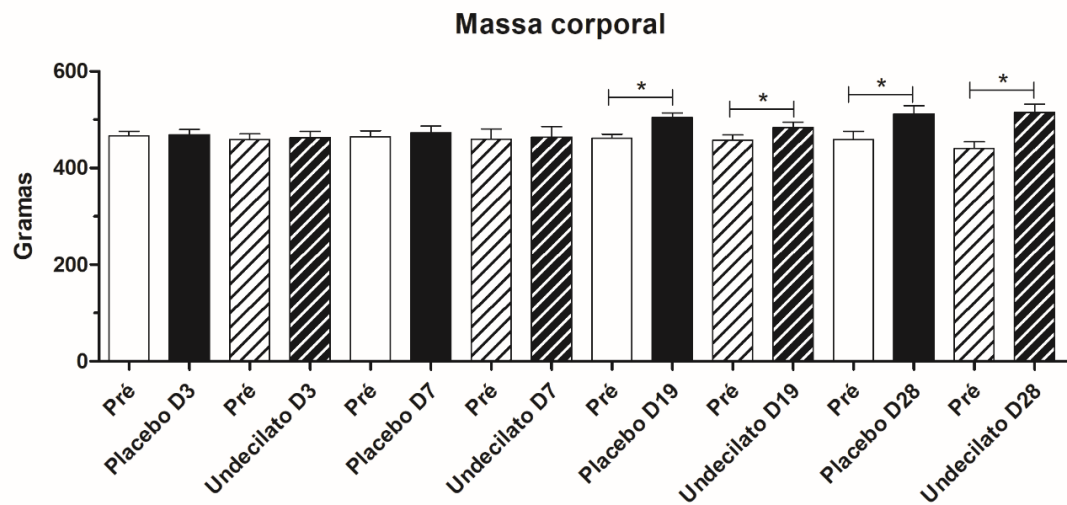


Figura 5 – Médias e desvios padrão das massas corporais de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Índice de massa corporal (IMC)

Verificou-se índice de massa corporal significativamente ($p < 0,05$) menor no grupo undecilato, quando comparado ao grupo placebo aos 28 dias de avaliação. Quando comparado com o pré-operatório (pré), observou-se redução significativa ($p < 0,05$) do IMC nos animais do grupo placebo aos 3 dias de avaliação, seguido de aumento significativo ($p < 0,05$) aos 19 e 28 dias (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4 - Médias e desvios padrão do índice de massa corporal (IMC) de ratos obesos submetidos à osteotomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D3	Pré	D3	Pré	D7	Pré	D7
0,92 ^A	0,80 ^{aB}	0,88 ^A	0,82 ^{aA}	0,82 ^A	0,82 ^{aA}	0,83 ^A	0,82 ^{aA}
(0,04)	(0,06)	(0,11)	(0,06)	(0,04)	(0,03)	(0,08)	(0,08)
Placebo		Undecilato		Placebo		Undecilato	
Pré	D19	Pré	D19	Pré	D28	Pré	D28
0,77 ^A	0,89 ^{aB}	0,82 ^A	0,71 ^{aA}	0,78 ^A	0,88 ^{aB}	0,76 ^A	0,82 ^{bA}
(0,04)	(0,10)	(0,07)	(0,24)	(0,05)	(0,04)	(0,09)	(0,04)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T pareado. ($p < 0,05$). Comparação entre pré-operatório e dia de avaliação.

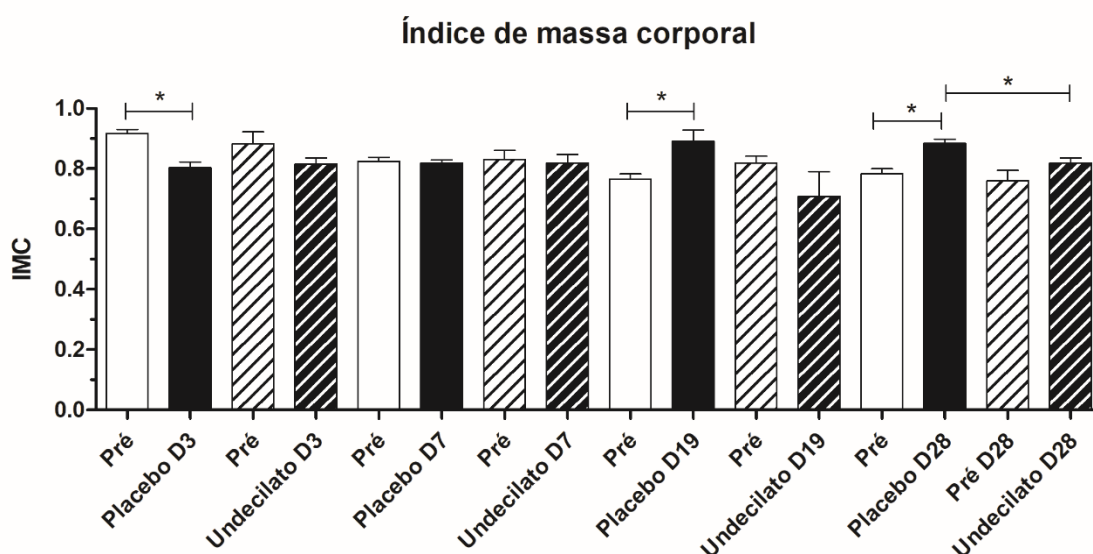


Figura 6 – Médias e desvios padrão do índice de massa corporal (IMC) dos ratos obesos antes da lesão e após serem submetidos à osteotomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Massa do tecido adiposo visceral

Não foram observadas diferenças significativas na massa do tecido adiposo visceral dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum tempo de avaliação (Tabela 5 e Figura 7).

Tabela 5 - Médias e desvios padrão da massa do tecido adiposo visceral de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

D3		D7		D19		D28	
Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
41,87 ^a	40,36 ^a	42,28 ^a	43,39 ^a	47,10 ^a	40,44 ^a	49,41 ^a	46,95 ^a
(13,38)	(7,02)	(8,15)	(17,19)	(8,41)	(9,36)	(7,90)	(13,14)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

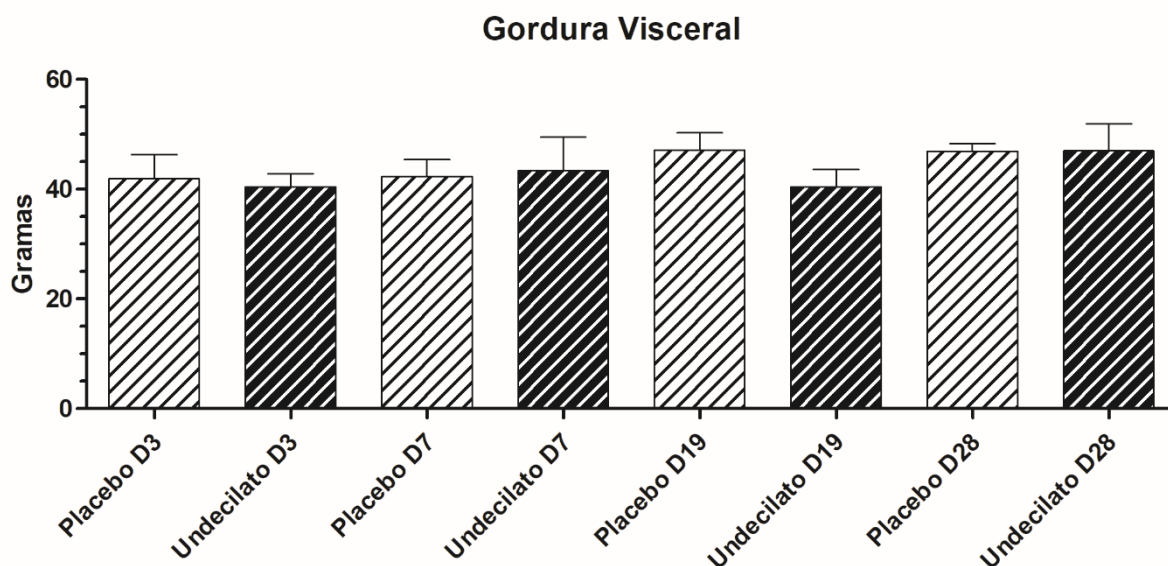


Figura 7 – Médias e desvios padrão da massa do tecido adiposo visceral de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Índice de adiposidade

Na avaliação do índice de adiposidade não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos undecilato e placebo em nenhum tempo de avaliação (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6 - Médias e desvios padrão do índice de adiposidade de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

D3		D7		D19		D28	
Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
8,84 ^a	8,68 ^a	8,91 ^a	9,09 ^a	9,32 ^a	8,30 ^a	9,62 ^a	9,19 ^a
(2,40)	(1,05)	(1,34)	(2,66)	(1,48)	(1,62)	(0,87)	(1,82)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

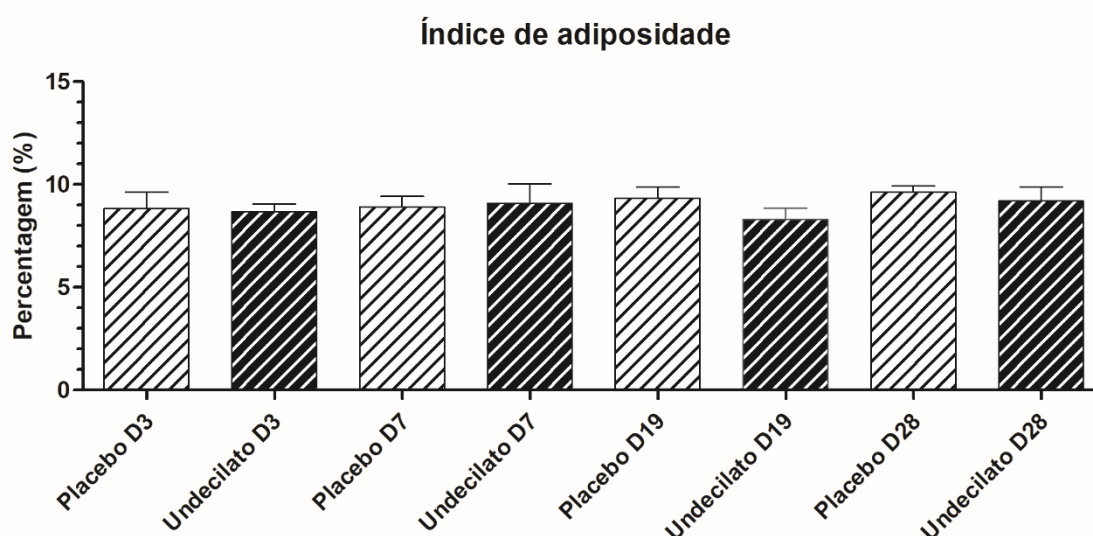


Figura 8 - Médias e desvios padrão do índice de adiposidade de ratos obesos submetidos à ostectomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Massa óssea total

Animais do grupo undecilato apresentaram massa óssea total significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparado com os animais do grupo placebo aos sete dias de avaliação. Não houveram diferenças significativas quando comparada a massa óssea total dos animais dos grupos undecilato e placebo com os animais controle (sem lesão), em nenhum dos tempos de avaliação (Tabela 7 e Figura 9).

Tabela 7 - Médias e desvios padrão da massa óssea total de tíbias de ratos normais e obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
0,98 ^A	0,95 ^a	0,89 ^{aA}	1,03 ^a	0,91 ^{bA}	1,03 ^a	1,02 ^{aA}	1,01 ^a	0,99 ^{aA}
(0,11)	(0,09)	(0,06)	(0,04)	(0,03)	(0,09)	(0,24)	(0,12)	(0,05)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

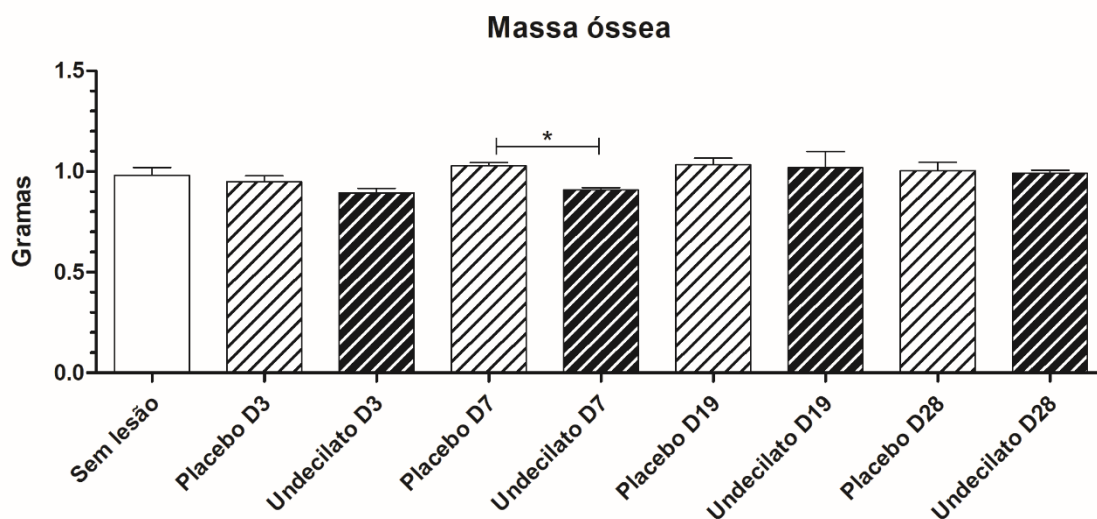


Figura 9 – Médias e desvios padrão das massas ósseas totais de tíbias de ratos obesos controle (sem lesão) ou submetidos à ostectomia proximal de tíbia e ao tratamento com placebo ou undecilato de testosterona, avaliados aos três, sete, 19 e 28 dias. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Massa óssea orgânica

Não foram observadas diferença significativas entre as massas ósseas orgânicas dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos avaliados. Animais tratados com undecilato apresentaram massa óssea orgânica significativamente maior ($p < 0,05$) dos que os animais sem lesão aos sete dias após a lesão (Tabela 8 e Figura 10).

Tabela 8 - Médias e desvios padrão da massa óssea orgânica de ratos obesos submetidos à osteotomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
0,048 ^A	0,050 ^a	0,069 ^{aA}	0,099 ^a	0,096 ^{aB}	0,049 ^a	0,070 ^{aA}	0,041 ^a	0,044 ^{aA}
(0,021)	(0,021)	(0,027)	(0,010)	(0,020)	(0,016)	(0,048)	(0,012)	(0,020)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

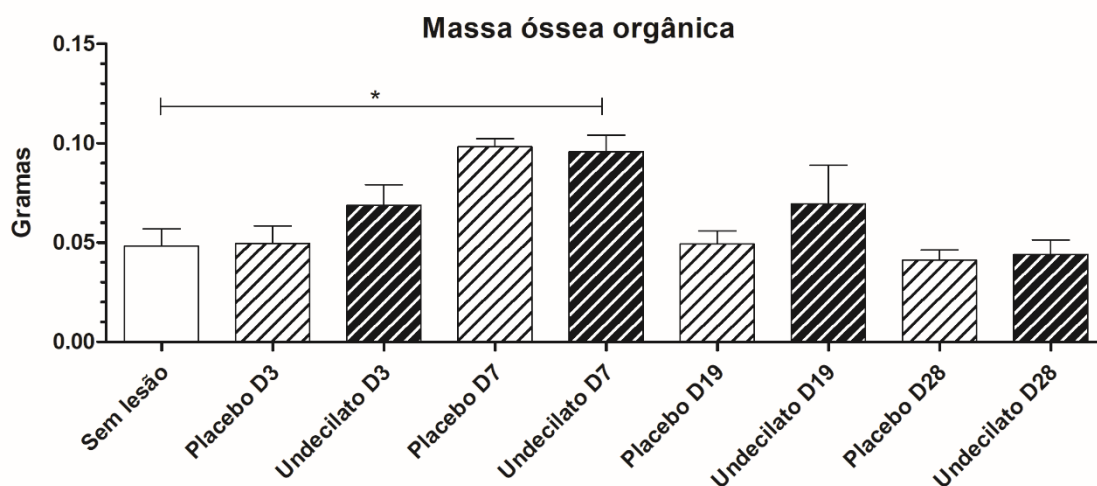


Figura 10 – Massa óssea orgânica de ratos obesos submetidos ou não à osteotomia proximal de tibia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Massa óssea mineral

Os animais do grupo undecilato apresentaram massa óssea mineral significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparado com os animais dos grupos placebo e controle (sem lesão), aos três e sete dias após a lesão (Tabela 9 e Figura 11).

Tabela 9 - Médias e desvios padrão da massa óssea orgânica de ratos obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
0,26 ^A	0,26 ^a	0,22 ^{bB}	0,22 ^a	0,21 ^{bB}	0,29 ^a	0,24 ^{aA}	0,28 ^a	0,28 ^{aA}
(0,03)	(0,03)	(0,01)	(0,02)	(0,02)	(0,04)	(0,05)	(0,03)	(0,02)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

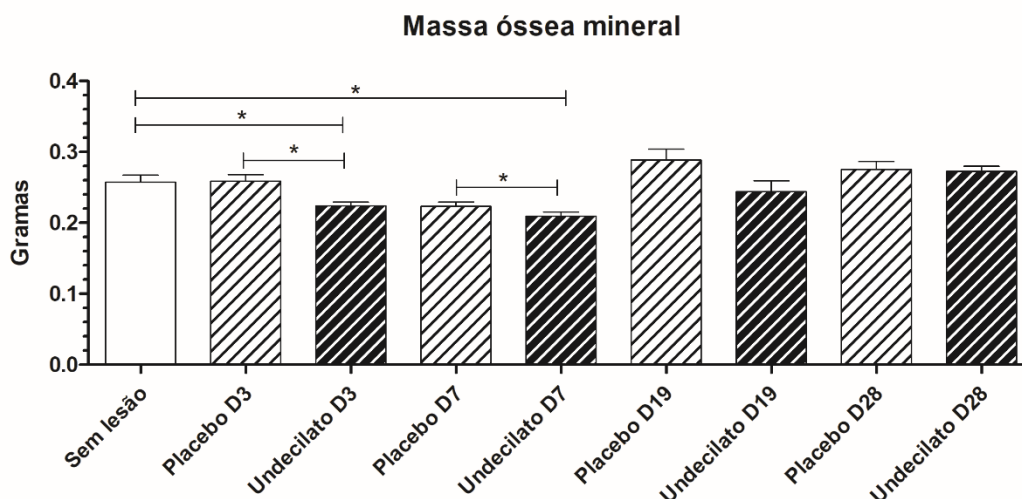


Figura 11 – Médias e desvios padrão da massa óssea mineral de ratos obesos submetidos ou não à ostectomia proximal de tíbia e tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Força máxima das tíbias

Não foram observadas diferenças significativas entre as forças máximas das tíbias dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos de avaliação. Os animais do grupo undecilato apresentaram força máxima significativamente menores que quando comparado com os animais do grupo controle (sem lesão) aos três, sete e 19 dias (Tabela 10 e figura 12).

Tabela 10 - Médias e desvios padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
116,9 ^A	90,14 ^a	82,50 ^{aB}	85,21 ^a	81,92 ^{aB}	107,5 ^a	93,20 ^{aB}	101,4 ^a	101,8 ^{aA}
(19,84)	(19,70)	(14,76)	(14,85)	(19,46)	(15,11)	(10,04)	(24,49)	(12,37)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

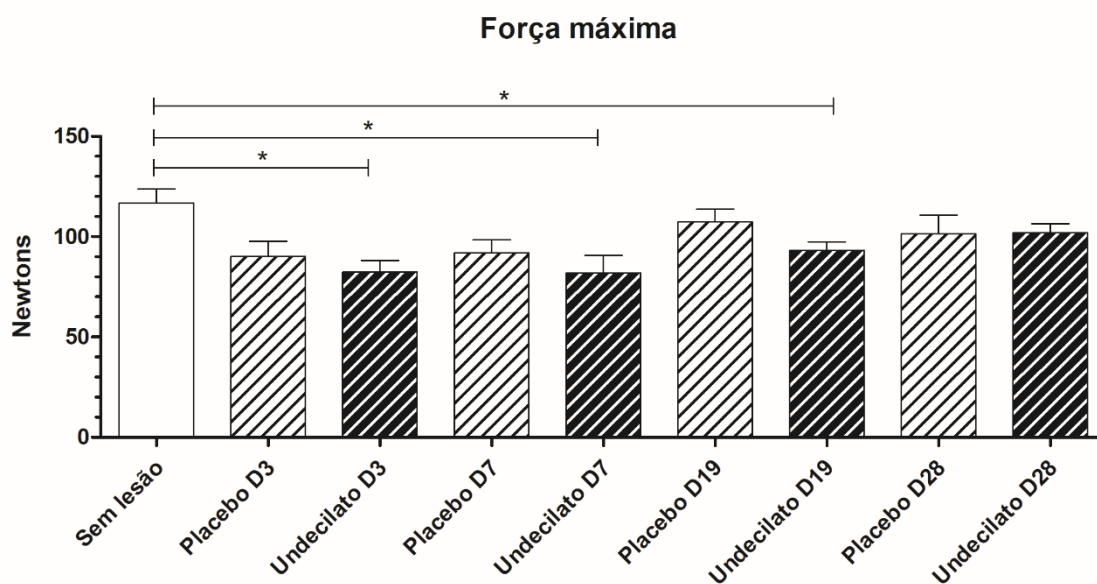


Figura 12 – Força máxima (N) de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Deformação até a falha das tíbias

Não foram observadas diferenças significativas entre as deformações até falha das tíbias dos animais dos grupos undecilato e placebo, em nenhum dos tempos de avaliação. Os animais do grupo undecilato apresentaram deformação até falha significativamente ($p < 0,05$) menores que quando comparado com os animais do grupo controle (sem lesão) aos sete dias (Tabela 11 e figura 13).

Tabela 11 - Média e desvio padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos do grupo controle e após ostectomia monocortical de tíbia proximal tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
725,00 ^A	674,30 ^a	575,70 ^{aA}	562,90 ^a	450,00 ^{aB}	606,70 ^a	650,00 ^{aA}	552,50 ^a	587,10 ^{aA}
(164,50)	(215,90)	(127,7)	(147,50)	(89,89)	(185,50)	(173,30)	(190,60)	(152,20)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

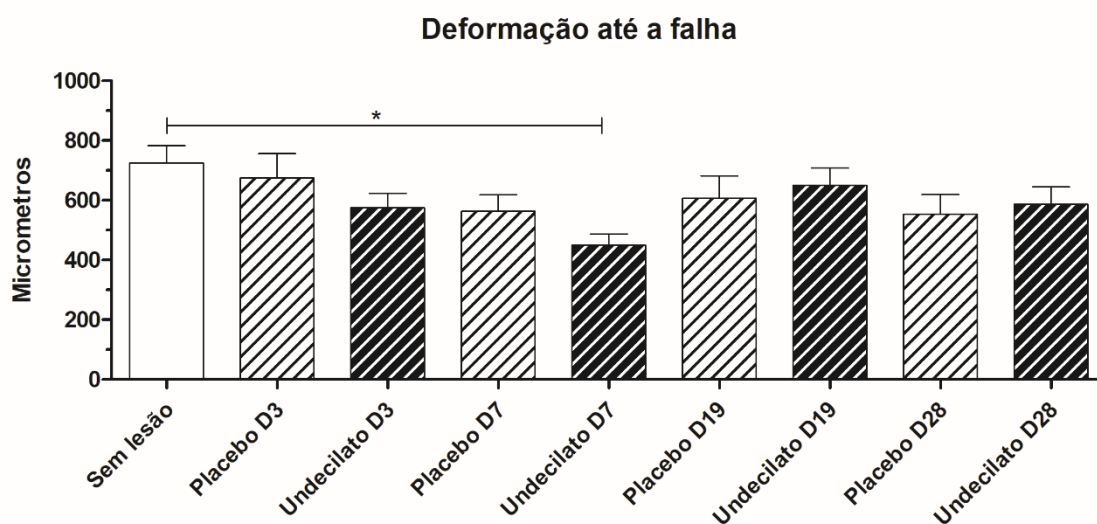


Figura 13 – Médias e desvios padrão da deformação até a falha de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical de tíbia proximal tratados com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias pós lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Módulo de elasticidade

Não foram observadas diferença significativa entre os módulos de elasticidade das tíbias dos animais dos grupos undecilato e placebo e nem entre os os animais sem lesão, em nenhum dos tempos avaliados (Tabela 12 e Figura 14).

Tabela 12 - Média e desvio padrão do módulo de elasticidade de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical de tíbia proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	D3		D7		D19		D28	
Controle (D7)	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
183,80 ^A	155,40 ^a	149,10 ^{aA}	167,20 ^a	160,80 ^{aA}	183,30 ^a	176,00 ^{aA}	186,80 ^a	180,50 ^{aA}
(53,33)	(33,74)	(23,59)	(24,70)	(40,96)	(28,87)	(32,61)	(16,61)	(37,55)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais controle e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

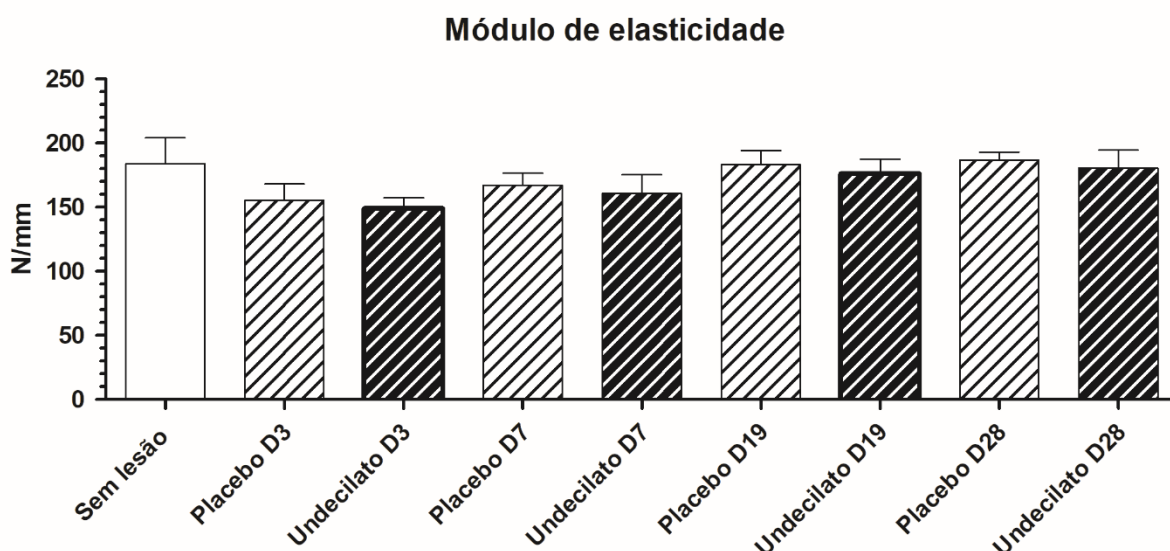


Figura 14 - Médias e desvios padrão do módulo de elasticidade de tíbias de ratos obesos submetidos ao teste de flexão em três pontos sem lesão e após ostectomia monocortical de tíbia proximal e tratamento com placebo ou undecilato de testosterona aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Avaliação histológica e histomorfométrica

Foi observada reparação óssea primária em ambos os grupos (Undecilato e Placebo). A reparação ocorreu de forma semelhante nos dois grupos e não foram notadas diferenças significativas no processo de reparação. Aos três dias foi observado tecido de granulação em toda extensão do defeito ósseo. Aos sete dias, houve o preenchimento total do defeito por osso esponjoso saudável com trabéculas delgadas com lacunas predominantemente preenchidas por osteócitos e recobertas por osteoblastos fusiformes, houve um predomínio de osteócitos em lacunas alargadas nos animais do grupo undecilato. Aos 19 dias após a lesão foi possível

observar processo de remodelação óssea em estágio intermediário sendo o canal medular parcialmente preenchido por osso esponjoso com trabéculas mais espessas e por tecido medular. Aos 28 dias processo de remodelação era um pouco mais avançado com canal medular predominantemente preenchido por tecido medular e poucas trabéculas ósseas espessas. A região correspondente ao defeito cortical estava totalmente preenchida por osso esponjoso com trabéculas espessas (Figura 15).

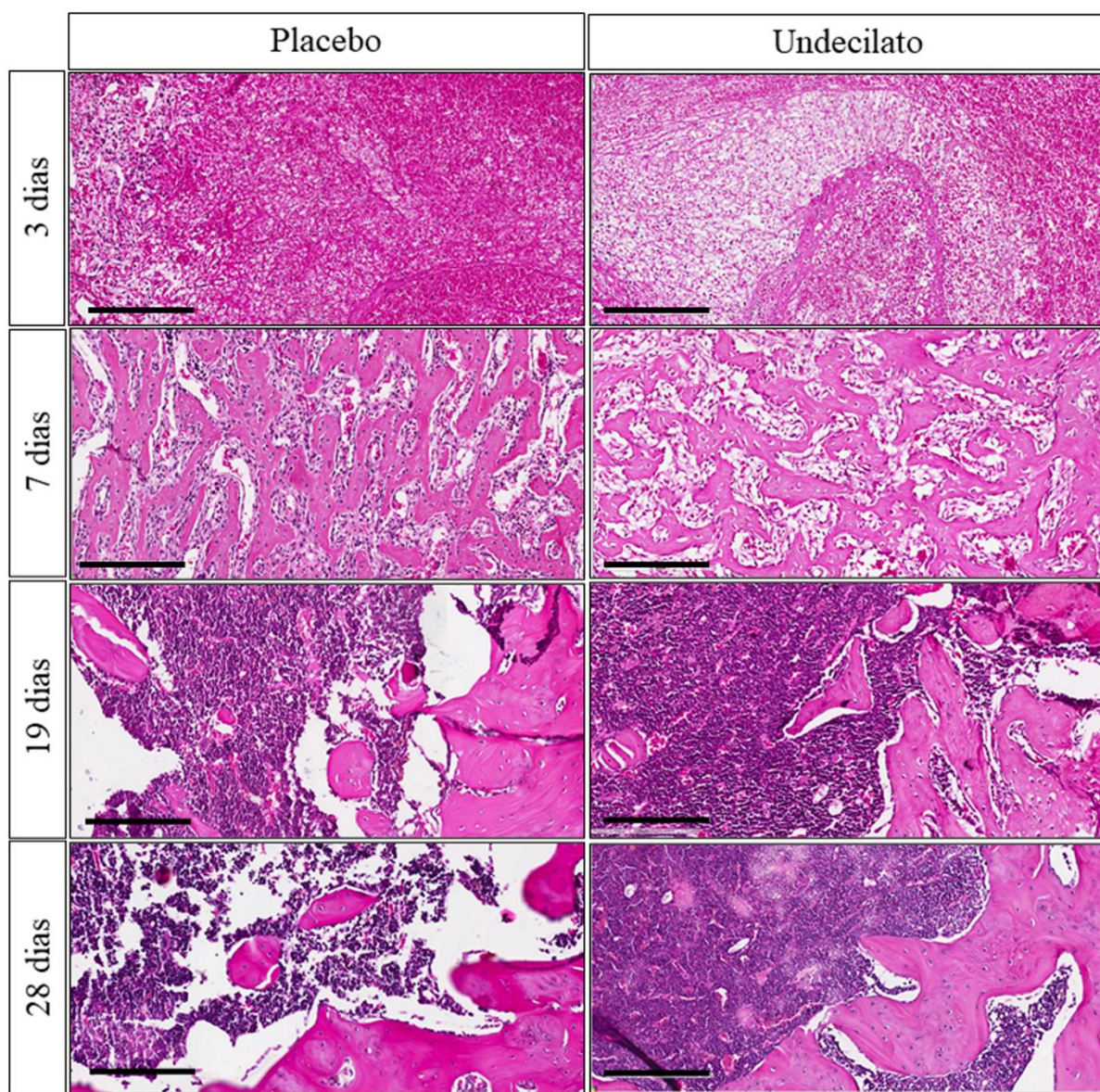


Figura 15 – Micrografia do osso neoformado em defeitos ósseos em tíbias de ratos obesos, tratados com placebo ou undecilato e testosterona aos três, sete 19 e 28 dias após a lesão. Observar que a reparação óssea ocorreu por primeira intesão, que o osso neoformado aos sete dias é esponjoso e que o processo de remodelação se encontra avançado aos 28 dias. Hematoxilina eosina. Aumento de 200 x. Barra = 200µm

Área de tecido ósseo no foco da lesão

Verificou-se área de tecido ósseo significativamente menor no foco de lesão dos animais do grupo undecilato, quando comparado aos animais do grupo placebo, aos sete dias. Não houveram diferença significativa na área de área de tecido ósseo dos animais do grupo undecilato e controle (sem lesão), em nenhum dos tempos de avaliação (Tabela 13 e Figura 16).

Tabela 13 - Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias de ratos obesos submetidas ou não a ostectomia monocortical e tratadas com placebo ou undecilato de testosterona, avaliações realizadas aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

Controle	D3		D7		D19		D28	
Sem lesão	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato	Placebo	Undecilato
3,24 ^A	2,74 ^a	3,10 ^{Aa}	4,14 ^a	3,00 ^{bA}	3,93 ^a	3,61 ^{aA}	3,73 ^a	3,67 ^{aA}
(1,51)	(1,31)	(1,04)	(0,60)	(0,85)	(1,16)	(0,81)	(1,05)	(0,84)

^a Nas linhas - médias com pelo menos uma letra minúscula comum não diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais tratado com placebo e undecilato, dentro de cada tempo de avaliação.

^A Nas linhas - médias com pelo menos uma letra maiúscula comum não difere pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais sem lesão e com lesão tratado com undecilato feita dentro de cada dia de avaliação.

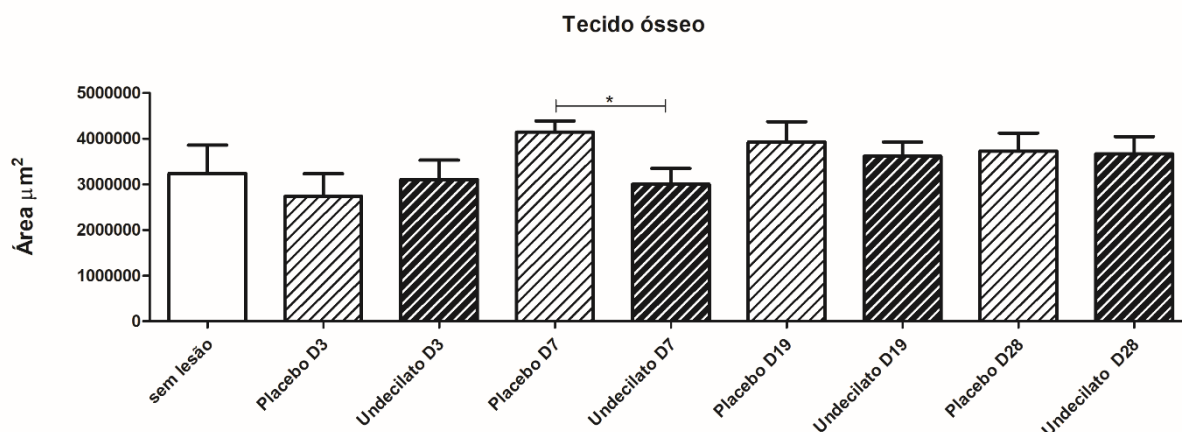


Figura 16 - Médias e desvios padrão da área de tecido ósseo de tíbias de ratos obesos submetidas ou não a ostectomia monocortical e tratados com placebo ou undecilato de testosterona, avaliações realizadas aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O propósito do presente trabalho foi fundamentado na hipótese de que níveis suprafisiológicos de testosterona circulante poderiam auxiliar na redução de gordura corporal de ratos obesos e ainda, ajudar no processo de reparação óssea desses animais. Níveis basais de testosterona e estrógenos são fundamentais para um bom metabolismo ósseo (STUBBS, 1996;

VANDENPUT *et al.*, 2004; KLEIN, 2014; GOLDS *et al.*, 2017) e alguns estudos mostram ainda que, quando aplicada em altas doses, ela é capaz de propiciar redução da taxa de gordura corporal e ainda gerar hipertrofia muscular (HERBST e BHASIN, 2004; PETER, 2005). Apesar disso, pouco se sabe ainda da influência do undecilato de testosterona, análogo da testosterona, na massa corporal e no processo de reparação óssea de animais obesos, mesmo esse fármaco sendo considerado como uma das melhores opções do mercado (HOHL *et al.*, 2009), devido sua longa ação e baixos efeitos colaterais. Chillarón (2016), descreve que o undecilato de testosterona é benéfico nas populações de pacientes diabéticos, com hipogonadismo e também em pacientes obesos, sendo essa nossa população de estudo

Dessa forma, a utilização neste estudo de undecilato de testosterona em uma população de ratos obesos embasou-se nas divergências encontradas na literatura acerca da obesidade e reparação óssea, em que, em alguns estudos ela foi vista como favorável ao processo de reparação óssea (ZHAO, 2007; CAO, 2011), enquanto por outros foi considerada desfavorável (SCHWETZ *et al.*, 2012; FRYE *et al.*, 2016; SCHELLER *et al.*, 2016). Além disso, trabalhando com a aplicação de testosterona em animais obesos nesse estudo, buscou-se uma nova estratégia para manejo da obesidade, visando melhorar a composição corporal dos animais por meio da redução da massa de tecido adiposo visceral. Na literatura, é descrita a correlação inversa entre a testosterona e a gordura (HERBST; BHASIN, 2004; CARMO *et al.*, 2012), visto que a testosterona inibe a captação de lipídios e a atividade da lipoproteína-lipase (LDL) em adipócitos, responsável pela estimulação da lipólise, aumentando o número de receptores b-adrenérgicos lipolíticos. Além disso, ela ainda é capaz de inibir a diferenciação de células precursoras de adipócitos (DE PERGOLA, 2000).

A dosagem de 8 mg/kg de undecilato de testosterona utilizada nesse trabalho, foi baseada no estudo desenvolvido por WEN *et al.* (2000) em ratos, e apesar de 8 mg/kg ser considerada uma dose suprafisiológica (KARAKIDA *et al.*, 2017) não propiciou redução de gordura corporal, como era esperado. No nosso trabalho, a ausência de redução de gordura corporal nos animais do grupo undecilato pôde ser observada por meio da avaliação da massa de tecido adiposo visceral e índice de adiposidade, que não diferiu significativamente entre os grupos undecilato e placebo. Era esperada menor massa de tecido adiposo visceral e índice de adiposidade no grupo undecilato. Herbst e Bhasin (2004) descreve que as mudanças induzidas na massa magra e gorda por meio da utilização de testosterona estão correlacionadas com as doses utilizadas. A melhor hipótese a cerca do emagrecimento gerado pela testosterona, é que os andrógenos promovem o comprometimento de células pluripotentes mesenquimais na

linhagem mio gênica e inibem a adipogênese, por meio de uma via mediada por receptor de andrógeno. Em estudos em humanos, indivíduos ao receberem doses exógenas de testosterona, apresentaram uma perda mais rápida da deposição de lipídios e diminuição seletiva da massa gorda no tecido adiposo visceral (PETER, 2005). Um estudo desenvolvido por Abdelhamed *et al.*(2015), mostrou que em ratos machos com idade hipogonadal, a terapia de reposição de testosterona diminuiu o tamanho das células de gordura visceral, interferindo na redução da quantidade de gordura visceral. É importante salientar, que a maioria dos estudos que trabalham com indivíduos obesos, nesses indivíduos os níveis séricos de globulina ligadora de hormônios sexuais, bem como de testosterona total, costumam estar diminuídos. Dessa forma, com aplicação exógena de testosterona em indivíduos deficientes da mesma, não é possível afirmar que eles realmente atingiram uma dose supra-fisiológica. Uma limitação do presente estudo foi a não avaliação dos níveis séricos da testosterona logo não é possível afirmar que os animais tiveram diminuição da testosterona basal em decorrência da obesidade. Acredita-se que a dosagem utilizada nesse estudo elevou a concentração de testosterona para níveis suprafisiológicas como o observado em um estudo semelhante que utilizou a mesma dose sem efeitos colaterais significativos (WEN *et al.*, 2000). Steffens *et al.* (2002), também observaram em seu estudo com ratos, que mesmo após aplicações semanais de testosterona em níveis suprafisiológicas, não houve queima de gordura. Eles atribuíram esse achado a um possível estresse, visto que os animais eram submetidos à aplicações semanais de testosterona e estima-se que possa ter acontecido o mesmo no presente estudo. Além do estresse das aplicações que pode ter elevado as citocinas inflamatórias interferindo na perda de gordura, deve-se levar em consideração que os animais continuaram a ingerir dieta hipercalórica e que não foram submetidos a nenhuma mudança de atividade que colaborasse para a perda de peso. O estresse é responsável pela liberação de cortisol, o qual possui relação direta a deposição de gordura e com a obesidade. A gordura visceral tem um número aumentado de receptores para o cortisol e o cortisol na presença da insulina ativa o processo de lipogênese superior ao processo de lipólise no tecido adiposo visceral (SUPLICY,2000).

A ausência de diferença significativa entre a avaliação de circunferência abdominal dos grupos placebo e undecilato, apesar de não ser esperada, corrobora com os dados encontrados na avaliação da gordura visceral e índice de adiposidade desse estudo. Era esperada uma menor circunferência abdominal nos animais do grupo undecilato, levando em consideração que a circunferência abdominal é considerada um dos métodos indicadores de obesidade (LACERDA *et al.*, 2015; NOVELLI, *et al.*, 2016) e a testosterona seria responsável por

estimular a lipólise, reduzindo então medidas como a circunferência abdominal. Com tudo, observou-se que o undecilato de testosterona não influenciou significativamente na diminuição da circunferência abdominal e nem na massa corporal. Esperava-se que os animais do grupo undecilato apresentassem diferenças na massa corporal, visto que testosterona e seus análogos, em doses suprafisiológicas nos seres humanos, podem gerar aumento de massa magra e também redução de gordura corporal (HERBST; BHASIN, 2004; CARMO *et al.*, 2012). Dessa forma, os animais submetidos a aplicação de testosterona poderiam apresentar maior massa corporal, devido ao anabolismo muscular, com consequente aumento de massa magra, ou ainda redução da massa corporal, devido ao declínio de gordura visceral e consequente emagrecimento. Quando avaliada a circunferência abdominal e massa corporal antes e após o tratamento, foi observada maior circunferência abdominal no dia três de avaliação e ainda maior massa corporal nos dias 19 e 28 de avaliação. Esse fato pode estar relacionado ao crescimento e ganho de peso dos animais ao longo dos dias do pós-operatório, visto que o crescimento esquelético de ratos Wistar termina em torno dos 120-140 dias (BOLAÑOS; DE ARRUDA, 2009) e o peso de um rato macho adulto pode atingir de 350 a 500 gramas (NEVES *et al.*, 2013) e dessa forma, os animais então ainda estavam ganhando massa corporal. Cogita-se ainda, a possibilidade de os animais terem um maior ganho de massa magra e muscular devido a ação anabólica da testosterona. Peter (2005), descreve que em roedores, a testosterona aumenta os sinais mediados pelo receptor β -adrenérgico para a lipólise em várias etapas da cascata lipolítica. Com isso, a testosterona é considerada um regulador potente da lipólise, o que favorece o emagrecimento dos animais, interferindo na circunferência abdominal e ainda na massa corporal, mas não foi possível observar isso nesse estudo. Entretanto, é importante lembrar que apesar da ação conhecida da testosterona na gordura, outros fatores são relevantes e também estão envolvidos no processo de emagrecimento. Apenas elevar os níveis de testosterona podem não ser o suficiente para levar a uma perda de peso. Podem ser necessárias alternativas como dieta e realização de atividade física para potencializar a ação da testosterona no organismo. A prática regular de exercícios físicos induz várias alterações hormonais e é responsável por provocar elevação nos níveis de testosterona (CUNHA, 2012), o que seria interessante em indivíduos obesos, como o grupo experimental desse estudo.

A menor massa óssea total observada nos animais do grupo undecilato em relação ao grupo placebo, no dia sete de avaliação não era esperada. Era previsto que o grupo undecilato apresentasse maior massa de tecido ósseo, devido à potencial ação anabólica da testosterona no osso, como foi descrita por Prakasam *et al.* (1999), Oliveira *et al.* (2010) e Wang *et al.* (2013).

Os estudos de Prakasam *et al.* (1999) e Wang *et al.*, (2013), apesar de não trabalharem com uma população de indivíduos obesos mostram que houve ação anabólica da testosterona no osso. No estudo de Prakasam *et al.* (1999), a análise da histomorfometria óssea das tíbias dos ratos orquiectomizados após a reposição de testosterona, mostrou que houve neutralização do efeito de porose intracortical, supressão da remodelação óssea e aumento a massa e densidade óssea. No estudo de Wang *et al.* 2013, foi observado por meio da utilização de doses baixas e fisiológicas de undecilato de testosterona a longo prazo, em humanos com osteoporose, maior densidade da massa óssea da coluna lombar e do colo do fêmur, e ainda melhor remodelação óssea. Já no estudo de Ng Tang Fui *et al.*, (2018), com indivíduos obesos, foi observado o efeito do tratamento com testosterona na remodelação e densidade óssea de homens obesos, submetidos a dieta e que receberam aplicações de undecilato de testosterona (mesmo fármaco utilizado em nosso estudo). Em seu estudo, houve redução da remodelação óssea, porém isso não foi convertido em uma maior densidade de massa óssea. Apesar do estudo de Ng Tang Fui *et al.* (2018) se tratar de indivíduos obesos, é importante salientar que sua população de estudo apresentava deficiência de testosterona, e as aplicações foram afim de suprir essa deficiência, não atingindo possivelmente uma dose suprafisiológica. Acredita-se, que no presente estudo, os animais do grupo undecilato apresentaram maior reabsorção óssea do que deposição óssea (observada também na avaliação histológica, a qual será discutida posteriormente), justificando então a menor massa óssea total. Levando em consideração que esse estudo trabalhou com populações de animais obesos, hipotetiza-se ainda, que os animais de um modo geral, em decorrência da obesidade podem ter tido uma maior inflamação, levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes com consequente maior reabsorção óssea (CAO, 2011). Essa inflamação possivelmente foi ainda mais exarcebada nos animais do grupo undecilato, em decorrência do estresse das aplicações semanais do fármaco, visto que o undecilato de testosterona é uma medicação oleosa, de administração lenta e que pode gerar dor durante a aplicação, principalmente pelo fato de os animais nem sempre serem colaborativos. Ainda em relação a massa óssea total, esperava-se que os animais do grupo undecilato apresentassem maior massa óssea total do que os animais do grupo controle (sem lesão), devido a quantidade de osso neoformado para reparação do defeito, porém isso não foi observado, visto que a massa óssea total dos dois grupos não diferiram. Os animais do grupo undecilato sofreram lesão óssea, e com isso, esperava-se que o osso ao ser lesionado e ao iniciar o processo de reparação óssea primária, fizesse deposição direta de tecido ósseo no local da lesão (SCHINDELER *et al.*, 2008), e consequentemente convertesse em um aumento de massa óssea total. Esperava-se ainda, que fosse observada uma maior massa óssea total nos animais do grupo undecilato em

decorrência de uma reação periosteal. Os animais do grupo controle (sem lesão), como não necessitaram realizar o processo de reparação óssea, deveriam apresentar menor massa óssea total. Dessa forma, acredita-se que a ausência de diferença entre a massa óssea total entre o grupo undecilato e controle (sem lesão) seja devido a um processo de reabsorção óssea dos animais do grupo undecilato, de forma que houve deposição óssea no foco na lesão mas prevaleceu o processo de reabsorção óssea e com isso as massas não difeririam.

A ausência de diferença significativa entre a avaliação de massa óssea orgânica entre os grupos placebo e undecilato nos mostra que o undecilato não influenciou significativamente na síntese e reabsorção dos tecidos não minerais do osso como órgão. A parte orgânica da matriz óssea é sintetizada pelos osteoblastos, sendo eles as células ósseas que mais expressam reatividade aos andrógenos (NOTELOVITZ, 2002). Dessa forma, esperava-se que com a utilização do undecilato de testosterona o grupo undecilato apresentasse maior massa óssea orgânica. Além disso, como a porção orgânica do osso é responsável pela resistência à fratura, (CASTRO JR et al., 2008) e ela não diferiu entre os grupos, foi possível observar no teste de flexão em três pontos (discutido posteriormente) que também não houve diferença na força entre os grupos. Já a maior massa óssea orgânica observada no dia sete de avaliação do grupo undecilato quando comparado com o grupo controle (sem lesão), se deve a injúria óssea, a qual levou a uma resposta inflamatória e à formação de tecido cicatricial no foco da lesão e em toda a região periosteal (SCHINDELER *et al.*, 2008).

A menor massa óssea mineral observada no grupo undecilato quando comparado com os grupos placebo e sem lesão, difere do esperado. Esperava-se que o grupo undecilato por meio da utilização de doses suprafisiológicas de testosterona apresentasse uma maior estimulação de mineralização óssea. Hipotetiza-se, que no nosso estudo possivelmente, os animais submetidos à aplicações de undecilato de testosterona tiveram os processos de reabsorção mais presentes do que o processo de deposição de matriz óssea, interferindo diretamente na massa óssea mineral. Alterações dos níveis séricos dos andrógenos estão associados com um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014) e dessa forma, supõe-se que doses suprafisiológicas de testosterona, fizeram com que prevalecesse os processos de reabsorção. Ahmad *et al.* (2013) mostraram resultados favoráveis em seu estudo de fraturas tibiais em coelhos, que com aplicações de decanoato de nandrolona (outro análogo da testosterona), houve uma alta atividade osteoblástica e uma melhor mineralização nos animais tratados com a testosterona. Entretanto, é importante lembrar que sua população de estudo não era obesa, não sofrendo então interferência do fator obesidade. No presente estudo, como foram

avaliados animais obesos, o processo de mineralização pode ter sido afetado pela obesidade. A obesidade pode levar a um processo inflamatório exacerbado no local da lesão óssea, e com isso pode ocorrer maior osteoclasia e, portanto, menor massa óssea mineral. O estudo desenvolvido por Gao *et al.* (2018), mostra que a obesidade influenciou negativamente na reparação de fraturas ósseas de camundongos, de forma que os animais do grupo obeso apresentaram retardo na cicatrização da fratura, além de níveis séricos do mediador inflamatório fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) persistentemente aumentados após a lesão óssea. O aumento dos mediadores inflamatórios possivelmente levou a maior osteoclasia e, consequente menor massa óssea mineral, retardando o processo de consolidação.

A avaliação histológica mostrou que o processo de reparação óssea nesse estudo ocorreu de forma primária tanto no grupo placebo quanto no grupo undecilato, havendo deposição direta de tecido ósseo no local lesionado. Além disso, pode ser observado que a reparação ocorreu de forma semelhante em ambos os grupos. A fase inflamatória do processo de reparação óssea, observada nos grupos placebo e undecilato aos três dias, também pode ser observada em um estudo que avaliou a ação da testosterona em feridas cutâneas em ratos (GONÇALVES, 2018). Diferente do presente estudo, a fase inflamatória ocorreu um pouco mais tardia, aos sete dias, período o qual houve preenchimento da ferida cutânea de todos os grupos, por tecido de granulação. No presente estudo, no dia sete, a análise qualitativa do tecido ósseo do foco da lesão mostrou que o grupo undecilato em relação ao grupo placebo apresentava lacunas ósseas mais alargadas, com mais osteócitos ativos, indicando um maior processo de reabsorção óssea. Acredita-se a maior reabsorção óssea observada nos animais do grupo undecilato do presente estudo possa estar relacionada a dose utilizada do fármaco ou ainda em decorrência do estresse promovido pela obesidade. Sabe-se que a obesidade está associada com alterações no perfil hormonal reprodutivo e que homens moderadamente obesos apresentam baixa quantidade de testosterona total (LIMA *et al.*, 2000), então dessa forma, existe uma possibilidade que a dosagem aplicada nesse estudo não tenha atingido uma dose suprafisiológica, pois os animais diante da obesidade poderiam apresentar deficiência de testosterona. Uma outra possibilidade, levando em consideração que os animais obesos não apresentassem deficiência em testosterona, é que por meio da administração de uma dose suprafisiológica de testosterona, possa ter ocorrido um *feedback* negativo no organismo, havendo diminuição da produção de testosterona endógena, e com isso houve diminuição da concentração total de testosterona, interferindo então no processo de reparação. Dessa forma, a diminuição dos níveis de andrógenos disponíveis, poderia levar a um aumento do tempo de vida de osteoclastos e favorecer a apoptose de osteoblastos, induzindo o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, como

descrito por Manolagas *et al.* (2002). Já em relação a possível reabsorção óssea ligada ao fator obesidade, acredita-se que houve aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes em decorrência da obesidade. Dessa forma, o aumento dessas citocinas pode promover atividade osteoclástica e reabsorção óssea por meio da modificação do receptor ativador de NF-kappa beta (RANK), RANK ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), como descrita por Cao, (2011). Destaca-se ainda que a produção excessiva de leptina pelos adipócitos na obesidade também interfere diretamente na formação óssea ou indiretamente na reabsorção óssea. O estudo de Ahmad *et al.* (2013), evidenciou que a utilização de análogos de testosterona (no caso, a nandrolona) em coelhos propiciou uma melhor cicatrização da fratura óssea, com predomínio de trabéculas espessadas, formação de lamelas ósseas e maior proliferação osteoblástica. Já o estudo de Ng Tang Fui *et al.*, (2018), o qual trabalharam com indivíduos obesos, foi evidenciado a redução da remodelação óssea em homens obesos tratados com testosterona, porém isso não foi convertido em uma maior densidade de massa óssea. A avaliação histológica do presente estudo, mostrou ainda que nos dias 19 e 28, o osso já estava em processo de remodelação, porém esse processo ainda não estava completo, como era esperado.

A avaliação histomorfométrica permitiu observar menor área de tecido ósseo no grupo undecilato quando comparado com o grupo placebo no sétimo dia de avaliação, o que não era esperado, visto que como discutido anteriormente, diversos estudos mostram que a testosterona está relacionada a formação e renovação óssea (NOTELOVITZ, 2002; VANDENPUT *et al.*, 2004; GUSMÃO, *et al.*, 2007) através da ativação do receptor de andrógenos e indiretamente, através da estimulação dos receptores de estrógenos após aromatização (NOTELOVITZ, 2002). Novamente, acredita-se que a menor área de tecido ósseo observada no grupo undecilato possa ser em decorrência de um maior processo de reabsorção óssea, tendo sido ocasionado por alterações nos níveis séricos de testosterona, visto que VANDERSCHUEREN *et al.* (2014) descrevem que os níveis de testosterona estão associados com um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Já a ausência de diferença significativa na área de área de tecido ósseo dos animais do grupo undecilato em relação ao grupo controle, não era esperada, visto que os animais do grupo undecilato ao sofrerem lesão óssea, realizaram reparação com deposição de osso no local da lesão, devendo apresentar maior área de tecido ósseo, o que não foi observado nesse estudo.

Os resultados de força máxima e deformação até a falha das tíbias entre os grupos undecilato e placebo, mostram que undecilato de testosterona não interferiu significativamente

na capacidade do osso de suportar carga e deformar, pois, suportaram da mesma forma a carga máxima e deformaram a mesma quantidade antes de fraturar. A menor força máxima do grupo undecilato em relação ao grupo controle (sem lesão) observada no dia três, está relacionada a perda de tecido ósseo, gerada pela lesão, a qual interferiu na força máxima. Assim como descrito por Loi *et al.*, (2016), nessa fase, os animais estavam em fase de inflamação, momento em que a iniciava-se a osteogênese e dessa forma o osso ainda estaria frágil. Já a menor força máxima encontrada no dia sete, nos animais undecilato quando comparado com controle (sem lesão), não era esperada pois, no dia sete os animais estavam no pico de reparação sendo então esperado que o grupo undecilato apresentasse maior força. Também era esperado que no dia 19 de avaliação, o grupo undecilato apresentasse maior força máxima, o que não foi observado. Independente da aplicação de testosterona, histologicamente, aos 19 dias, o osso já estaria em fase final de reparação e dessa forma já teria recuperado sua força. Além disso, como a testosterona influencia diretamente em uma maior massa óssea, com a aplicação de undecilato de testosterona acreditava-se em uma maior massa óssea e consequentemente maior força máxima, mas como já descrito, não foi observado. O resultado de menor deformação até a falha observada no grupo undecilato no sétimo dia de avaliação quando comparado com o controle (sem lesão), reforçam os resultados encontrados na avaliação de força máxima, em que o osso mesmo no seu pico de reparação, ainda estava mais frágil. Visto tudo isso, foi possível observar que o undecilato não proporcionou maior resistência no osso. Clarke e Khosla (2009), descrevem que indivíduos com deficiência de androgênio podem ter densidade mineral óssea reduzida (DMO), o que leva a redução da força esquelética e aumenta o risco de fratura.

O módulo de elasticidade também não apresentou diferenças entre os grupos placebo, undecilato e controle, o que já era esperado, levando em consideração que o módulo de elasticidade foi obtido por meio da força máxima e taxa de deformação. Sabendo que o módulo de elasticidade tem relação direta com a mineralização da matriz extracelular (FORESTIER-ZHANG; BISHOP, 2015), os resultados encontrados corroboram com o resultado da avaliação de massa óssea mineral, o qual não diferiu entre o grupo placebo e undecilato.

A literatura em relação a influência da testosterona na avaliação de força máxima, deformação até a falha e módulo de elasticidade do osso ainda é escassa. Sabe-se que esses parâmetros estão relacionados a resistência do osso, e podem sofrer interferência do fator obesidade, que diminui a massa óssea e consequentemente diminui a resistência do osso, pois quanto maior a massa óssea mais resistente ele é. Ainda é importante lembrar que indivíduos obesos podem ter redução da testosterona basal (LIMA *et al.*, 2000), dessa forma, com uma menor concentração de testosterona há reflexos na massa óssea e consequentemente resistência

do osso. Hipotetiza-se que nesse estudo, por meio de aplicações semanais de 8 mg/kg em animais obesos, pode-se não ter atingido uma dose supra-fisiológica de testosterona nos animais devido a obesidade. Dessa forma, não foi possível identificar se a testosterona realmente não influenciou na resistência óssea, como esperado, ou se os efeitos deletérios da obesidade prevaleceram.

CONCLUSÃO

Por meio desse estudo, foi possível concluir que a utilização do undecilato de testosterona na população de ratos obesos não foi capaz de diminuir a massa de tecido visceral e índice de adiposidade, não propiciando redução de taxa de gordura corporal. O undecilato de testosterona foi capaz de estimular produção de massa óssea orgânica e aumentar a atividade do osteócito, entretanto não teve influência positiva na produção massa óssea total e mineral, e nem aumentou a área de tecido ósseo neoformado. Também não foi observado melhora na resistência óssea.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, A.; HISASUE, S.; SHIRAI, M. et al. Testosterone replacement alters the cell size in visceral fat but not in subcutaneous fat in hypogonadal aged male rats as a late-onset hypogonadism animal model. **Research and reports in urology**, v.7, p.35–40, 2015.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. 2002.
- BOLAÑOS, M.A.C; DE ARRUDA, M. Velocidade de crescimento a partir do peso corporal de ratos machos wistar. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.3, n.18, p.478-484, 2009.
- BUDZIK, J.F.; LEFEBVRE, G.; BEHAL, H. et al. Bone marrow perfusion measured with dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging is correlated to body mass index in adults. **Bone**, v. 99, p. 47-52, 2017.
- BURIM, R.A. **Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar sob ação sistêmica de Icariin: estudo radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico**. 2013. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- CAO, J.J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 6, p. 1-7, 2011.
- CARMO, E.C.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E.M. Esteróides anabolizantes: do atleta ao cardiopata. **Revista da Educação Física / UEM [online]**, v. 23, n. 2, pp. 307-318, 2012.

CHILLARÓN, J.J.; MIRO, M.F.; ALBAREDAS, M. et al. Testosterone undecanoate improves lipid profile in patients with type 1 diabetes and hypogonadotrophic hypogonadism. **Endocrine Journal**, v.63, n.9, p. 849-855, 2016.

CUNHA, F.V.M.; FILHO, O.F.M.; MOURA, F.S. et al., Efeito do exercício físico e da administração de testosterona na consolidação de fraturas de tíbia em ratos. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 25, n. 4, p. 777-784, 2012.

DE PERGOLA, G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. **International Journal of Obesity**, v.24, p.59-63, 2000.

FERRUCCI, L.; CORSI, A.; LAURETANI, F. et al. The origins of age-related proinflammatory state. **Blood**, v.105, n.6, p. 2294-2299, 2005.

FRYE C. W.; SHMALBERG, J. W.; WAKSHLAG, J. J. Obesity, Exercise and Orthopedic Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.46, n.5, p.831-841, 2016.

FORESTIER-ZHANG, L. & BISHOP, N. Bone strength in children: understanding basic bone biomechanics. **Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition**, v. 101, n. 1, p. 2–7, 2015.

GAO, F.; LV, T.-R.; ZHOU, J.-C. & QIN, X.-D. Effects of obesity on the healing of bone fracture in mice. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, n. 1, 2018.

GOLDS, G.; HOUDEK, D.; ARNASON, T. Male Hypogonadism and Osteoporosis: The Effects, Clinical Consequences, and Treatment of Testosterone Deficiency in Bone Health. **International Journal of Endocrinology**, v.2017, p.1-15, 2017.

GONÇALVES, V.P. **Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea**, 2018. Tese (doutorado em odontologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara. 2018.

GUSMÃO, C.V.B.; PAULI, J.R.; ALVES, J.M. et al. **A influência do estímulo mecânico na expressão da quinase de adesão focal no osso in vivo**. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. v. 12, n. 3, 2007.

HERBST, K. L.; BHASIN, S. Testosterone action on skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.7, n.3, p. 271–277, 2004.

HOHL, A.; MARQUES, M.O.T.; CORAL, M.H.C. et al. Evaluation of late-onset hypogonadism (andropause) treatment using three different formulations of injectable testosterone. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.8, p.989-995, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: **Histologia Básica**. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 136–56, 2004.

KARAKIDA, L. M.; DE ARAUJO, C.M.; JOHANN, A.C.B.R. et al. Interaction of Anabolic Androgenic Steroids and Induced Tooth Movement in Rats. **Brazilian Dental Journal** [online]., v. 28, n. 4, p. 504-510, 2017.

KLEIN, B.G. **Cunningham Tratado de fisiologia veterinária** – 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.624, 2014.

KLEIN, P.; SCHELL, H.; STREITPARTH, F. et al. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. **Journal of Orthopaedic Research.**, n.21, v.4, p.662-669, 2003.

LACERDA, D. R.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N. M. et al., Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. *Experimental Physiology*, v. 100, n. 1, p. 44–56, 2015.

LIMA, N.; CAVALIERI, H.; HALPERN, A. et al. A função gonadal do homem obeso. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**, v.44, n.1, p.31-37, 2000.

NG TANG FUI, M.; HOERMANN, R.; NOLAN, B. *et al.* Effect of testosterone treatment on bone remodelling markers and mineral density in obese dieting men in a randomized clinical trial. **Scientific Reports**, v.8, n.9099, 2018.

NEVES, S. M. P.; PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Experimentação da FCF-IQ/USP**. Silvânia M. P. Neves (et al.) – São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p. il.

NIELSEN, T.L.; HAGEN, C.; WRAAE, K. et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. **J Clin Endocrinol Metab.**; v.92, n.7, p.2696-705, 2007.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and sterility**, v. 77, n. 4, p. 34-41, 2002.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, p.111-119, 2007.

OLIVEIRA, L.G; GUIMARÃES, M.L.R. **Osteoporose no homem**. Revista Brasileir de Ortopedia., v.45, n.5, p.392-6, 2010.

PETER, A. Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome. **Biochimie**, v.87, p.39-43, 2005.

PRAKASAM, G.;YEH, J.K.; CHEN, M.M. et al. Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchiectomized rats. **Bone**, 491-7, 1999.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 3.ed., p.264, 2007.

SCHELLER, E.L.; KHOURY, B.; MOLLER, K.L. et al. Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v.7, p.1-13, 2016.

SCHWETZ, V.; PIEBER, T.; OBERMAYER-PIETSCH, B. The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. **European Journal of Endocrinology**, v.166, n.6, p.959-967, 2012.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P. et al. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Semin Cell Development Biol.**, 108(1):5-13, 2008.

SHILLS, M. E.; OLSON, J.; SHIKE, M. et al. **Tratado da nutrição moderna na saúde e na doença**. 10.ed. São Paulo: Editora Manole, 2009.

STEFFENS, J.P.; COIMBRA, L.S; RAMALHO-LUCAS, P.D. et al. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats--a radiographic and histologic pilot study. **Journal Periodontol**, v. 83, n.11, p. 1432-1439, 2012.

STUBBS, W.P.; BLOOMBERG, M.S.; SCRUGGS, S.L. et al. Effects of prepubertal gonadectomy on physical and behavioral development in cats, **Journal of the american veterinary medical association**, v. 209, n.11, p. 1864-1871, 1996.

SUPLICY, H. L. Obesidade visceral, resistência à insulina e hipertensão arterial. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 7, n. 2, p136-140, 2000.

TURNER, C. H. Biomechanics of Bone: Determinants of Skeletal Fragility and Bone Quality. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 2, p. 97–104, 2002

VANDENPUT, L.; SWINNEN, J. V. et al. Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.19, n.9, p. 1462-1470, 2004.

WANG, Y.J.; ZHAN, J.K; HUANG, W. et al. Effects of low-dose testosterone undecanoate treatment on bone mineral density and bone turnover markers in elderly male osteoporosis with low serum testosterone. **Internacional Journal of Endocrinology**. 2013.

WEN, X.H.; WANG, X.H.; TONG, J.S. et al. Reversible effect of testosterone undecanoate injection on spermatogenesis in rats. **Asian Journal of Andrology**, v.2, n.3, 207-211, 2000.

ZHAO, L.J.; LIU, Y.J.;LIU, P.Y.et al. Relationship of obesity with osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; v.92, 1640-6, 2007.

ANEXO 1

Comitê de Ética em Experimentação animal

**Uniube**

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-001/2020

Uberaba, 9 de março de 2020

Ilmo. Prof.

ENDRIGO GABELLINI LEONEL ALVES

Assunto: Encaminha processo nº 028/2019, sobre o protocolo de aula prática "*Influência do undecilato de testosterona na reparação óssea de ratos normais e obesos*".

Prezado (a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido a avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 08/11/2019, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

Prof. Joly F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

ANEXO 2

Formalina tamponada a 10% - 5 Litros

1. Em uma balança de precisão, pesar 32,5 gramas de fosfato de sódio dibásico avidro;
2. Diluir o fosfato de sódio dibásico avidro em 2.250 ml de água destilada;
3. Pesar 20 gramas de fosfato de sódio monobásico monohidratado;
4. Diluir o fosfato de sódio monobásico monohidratado em 2.250 ml de água destilada;
5. Misturar as duas soluções obtidas em 500 ml de formol e armazenar o volume total em um galão.

ANEXO 3

Protocolo de preparo de EDTA 10% (pH 7,4) – 1 litro (para descalcificação óssea)

1. Em uma proveta graduada, colocar aproximadamente 800 mL de água destilada ou de osmose reversa;
2. Em balança de precisão, pesar 100 g de EDTA tetrassódico;
3. Em um Becker, adicionar a água e o EDTA, e diluir completamente o soluto com um agitador magnético;
4. Com auxílio de um medidor de pH, corrigir o pH da solução para 7,4, adicionando ácido clorídrico (HCl) 37% quando básica, ou hidróxido de sódio (NaOH) sólido quando ácida;
5. Despejar a solução em uma proveta e completar com água destilada até atingir 1.000 mL.

ANEXO 4

Protocolo de preparo de PBS 1,5 molar – 1 litro

1. Em uma proveta, colocar aproximadamente 800 mL de água ultrapura;
2. Dissolver em água ultrapura com auxílio de um agitador magnético:
 - 80 g de cloreto de sódio
 - 2 g de cloreto de potássio
 - 11,5 g de fosfato de sódio avidro
 - 2 g de fosfato de potássio
3. Com auxílio de um medidor de pH, corrigir o pH da solução para 7,2, adicionando ácido clorídrico (HCl) 37% quando básica, ou hidróxido de sódio (NaOH) sólido quando ácida;
4. Despejar a solução em uma proveta e completar com água ultrapura até atingir 1.000 mL;
5. Transferir para frasco âmbar;
6. Armazenar a 4°C.

Notas:

- i. Dentro de alguns dias, quando eficientemente preparada, a solução formará cristais no fundo do frasco.
- ii. Para a utilização, descristalize a solução por imersão do frasco em água em temperatura ambiente ou em banho-maria a 30°C.

Protocolo de preparo de PBS 0,15 molar – 1 litro

1. Em uma proveta, colocar 100 mL de PBS 1,5 molar e 900 mL de água ultrapura;
2. Transferir para frasco âmbar;
3. Armazenar a 4°C.

Notas:

- i. Esta solução é utilizada para armazenamento dos ossos após a descalcificação.
- ii. Esta solução é utilizada no preparo das amostras para dosagem de cálcio.