

Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
PPGSN

Dissertação

Efeitos da acupuntura e da administração de 17 beta-estradiol na massa corporal de ratas submetidas a ovário-salpingo-histerectomia

Pedro Henrique Paes Scott e Silva

Ouro Preto
2021



UFOP



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO

ESCOLA DE NUTRIÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PEDRO HENRIQUE PAES SCOTT E SILVA

**EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ADMINISTRAÇÃO DE 17
BETA-ESTRADIOL NA MASSA CORPORAL DE RATAS
SUBMETIDAS A OVÁRIO-SALPINGO-HISTERECTOMIA**

OURO PRETO – MG

2021

PEDRO HENRIQUE PAES SCOTT E SILVA

**EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ADMINISTRAÇÃO DE 17
BETA-ESTRADIOL NA MASSA CORPORAL DE RATAS
SUBMETIDAS A OVÁRIO-SALPINGO-HISTERECTOMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia de Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi

OURO PRETO – MG

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586e Silva, Pedro Henrique Paes Scott E .
Efeitos da acupuntura e da administração de 17 beta-estradiol na
massa corporal de ratas submetidas a ovário-salpingo-histerectomia.
[manuscrito] / Pedro Henrique Paes Scott E Silva. - 2021.
106 f.: il.: color., tab.. + Vídeo.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e
Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Acupuntura. 2. Menopausa. 3. Osteoporose. I. Isoldi, Mauro Cesar. II.
Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 613.2

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
NUTRICAÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedro Henrique Paes Scott e Silva

Efeitos da acupuntura e da reposição de estrógeno em modelo animal de ratas ovario-salpingo-histerectomizadas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021.

Membros da banca

Dr. Mauro César Isoldi - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr. Victor Neiva Lavorato (Centro Universitário Governador Ozanam Coelho)
Dr. Guilherme de Paula Costa (Universidade Federal de Ouro Preto)

Mauro César Isoldi, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 10/8/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cesar Isoldi, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 10/08/2021, às 10:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0204669** e o código CRC **89735B30**.

RESUMO

Osteoporose, uma doença metabólica caracterizada por baixa massa óssea, deterioração da microarquitetura do tecido ósseo e aumento da suscetibilidade a fraturas, é muito prevalente na população mundial, sobretudo nas mulheres após a menopausa. Diante da importância do tema, o presente trabalho teve como objetivo descrever técnicas para a indução dessa condição em um modelo animal e também descrever uma forma de realização de tratamento com Acupuntura, com base na medicina complementar. Foi utilizado o modelo de ratas ovariectomizadas, que é considerado o padrão ouro para a indução de menopausa experimental nesses animais. A descrição de uma técnica de acupuntura experimental e de sua avaliação na mudança da massa corporal das ratas com menopausa induzida cirurgicamente, em relação ao tratamento com 17 beta-estradiol, são relevantes, pois o índice de massa corporal está diretamente relacionado com o risco de osteoporose em mulheres na menopausa. Além disso, a acupuntura é uma especialidade médica reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina e uma especialidade Médico Veterinária reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, além disso, a acupuntura faz parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro. Dessa forma a acupuntura é uma prática terapêutica tanto em animais quanto em seres humanos, com grande potencial de difusão pelo território brasileiro, e de baixo custo. Os resultados dessa pesquisa sugerem que a reposição hormonal tardia com 17 beta-estradiol na dosagem de 50 µg/Kg via intramuscular, aplicada duas vezes na semana, por 10 semanas, teve influência benéfica para evitar o ganho de peso excessivo nos animais após a ovário-salpingo-histerectomia. Conclui-se também que o tratamento com acupuntura, aplicados após 10 semanas da ovário-salpingo-histerectomia, duas vezes por semana, durante 10 semanas, não teve influência no ganho de peso das ratas. O presente estudo também conclui que a prática experimental de acupuntura em ratos é uma alternativa viável para o estudo dessa modalidade terapêutica e que os animais apresentam boa tolerância ao agulhamento e não demonstraram repulsa à prática. Logo é uma alternativa segura para os animais, ética e viável experimentalmente. Mais estudos devem ser realizados para verificar se a prática da acupuntura nas ratas teriam efeito para o tratamento dos outros sintomas relacionados à menopausa e deficiência estrogênica.

Palavras-chave: Acupuntura; Menopausa; Osteoporose.

ABSTRACT

Osteoporosis, a metabolic disease characterized by low bone mass, deterioration of bone tissue microarchitecture and increased susceptibility to fractures, is very prevalent in the world population, especially in women after menopause. Given the importance of the theme, the present study aimed to describe techniques for inducing this condition in an animal model and also to describe a way of carrying out treatment with Acupuncture, based on complementary medicine. The model of ovariectomized rats was used, which is considered the gold standard for the induction of experimental menopause in these animals. The description of an experimental acupuncture technique and its assessment of the body mass change of rats with surgically induced menopause, in relation to treatment with 17 beta-estradiol, are relevant, because the body mass index is directly related to the risk of osteoporosis in menopausal women. In addition, acupuncture is a medical specialty recognized by the Federal Council of Medicine and a Veterinary Medical specialty recognized by the Federal Council of Veterinary Medicine, in addition, acupuncture is part of the National Policy for Integrative and Complementary Practices (PNPIC) in the Brazilian Health System (SUS). Thus, acupuncture is a therapeutic practice in both animals and humans, with great potential for diffusion throughout the Brazilian territory, and at low cost. The results of this research suggest that late hormone replacement with 17 beta-estradiol at a dose of 50 µg / kg intramuscularly, applied twice a week, for 10 weeks, had a beneficial influence to prevent excessive weight gain in animals after the ovary - salpingo -hysterectomy. It is also concluded that the treatment with acupuncture, applied after 10 weeks of ovary-salpingo-hysterectomy, twice a week, for 10 weeks, had no influence on the weight gain of the rats. The present study also concludes that the experimental practice of acupuncture in rats is a viable alternative for the study of this therapeutic modality and that the animals have good tolerance to needling and have not shown repulsion to the practice. Then, it is a safe, ethical and experimentally viable alternative for animals. Further studies should be carried out to verify whether the practice of acupuncture in rats would have an effect in the treatment of other symptoms related to menopause and estrogen deficiency.

Keywords: Acupuncture; Menopause; Osteoporosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Padronização dos locais de administração dos fármacos nos animais.....	53
Figura 2: Posicionamento em decúbito dorsal.....	59
Figura 3: Aplicação do creme para remoção dos pelos	60
Figura 4: Campo operatório preparado.....	60
Figura 5: Incisão de pele.....	62
Figura 6: Tração do omento	63
Figura 7: Exposição do ovário, cornos uterinos e transfixação para ligadura uterina....	63
Figura 8: Síntese abdominal	64
Figura 9: Síntese intradérmica.....	64
Figura 10: Aspecto final pós-operatório imediato.....	65
Figura 11: Ferida cirúrgica 3 dias de pós-operatório.....	67
Figura 12: Ferida cirúrgica 6 dias de pós-operatório.....	67
Figura 13: Organograma dos grupos experimentais.....	75
Figura 14: Delineamento experimental	76
Figura 15: Pote plástico utilizado para fabricação do aparato de contenção.....	78
Figura 16: Desenho esquemático do aparato de contenção para acupuntura em ratos... 79	
Figura 17: Aparato de contenção do animal para aplicação de acupuntura. Vista lateral	79
Figura 18: Aparato de contenção do animal para aplicação de acupuntura. Vista superior.	80
Figura 19: Representação esquemática da localização dos pontos E36, B23 e VG3 no rato	84
Figura 20: Acupuntura no ponto E36	85
Figura 21: Vista lateral do animal durante a sessão de acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3	85
Figura 22: Vista superior do animal durante a sessão de acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3.....	86
Figura 23: Avaliação da massa corporal	88
Figura 24: Avaliação da massa corporal das ratas no dia da cirurgia e 20 semanas após a cirurgia ou cirurgia Sham	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de EPIs utilizados para o procedimento anestésico em ratos	51
Tabela 2: Lista de materiais utilizados para o procedimento anestésico em ratos	52
Tabela 3: Lista de fármacos utilizados para o procedimento anestésico em ratos	52
Tabela 4: Ficha de procedimento individualizada.....	55
Tabela 5: Resultados da alteração da massa corporal (MC) das ratas, em gramas, avaliada nos grupos OSH-C, OSH-ACP, OSH-RH, SHAM.....	87

LISTA DE VÍDEOS

Vídeo 1: Demonstração dos estágios anestésicos em um rato.....	48
Vídeo 2: Demonstração de técnica de ovário-salpingo-histerectomia em rata	65
Vídeo 3: Demonstração de contenção de um rato para acupuntura	80
Vídeo 4: Demonstração de procedimento de acupuntura experimental em rato.....	86

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
Lista de vídeos	8
Sumário	9
Introdução Geral:	8
Objetivos Gerais:	9
Justificativa:.....	9
1. Capítulo I: Revisão de literatura.....	11
1.1. Menopausa.....	11
1.1.1 Sangramento durante a perimenopausa:	12
1.1.2 Alteração na fertilidade e contracepção	13
1.1.3 Sintomas vasomotores.....	16
1.1.4 Sintomas geniturinários e sexuais.....	19
1.1.5 Alterações cognitivas e do humor.....	21
1.1.6 Perturbações do sono	22
1.1.7 Alterações cardiovasculares e metabólicas	23
1.1.8 Alterações osteoarticulares na menopausa.....	24
1.1.9 Alterações do ciclo hormonal.....	25
1.2 Osteoporose.....	27
1.2.1 Osteoporose pós-menopáusia.....	28
1.2.2 Fisiopatologia da perda óssea	29
1.2.3 Diagnóstico da osteoporose:.....	32
1.2.4 Fatores de risco para Osteoporose:	33
1.2.5 Manejo da osteoporose	33
1.3 Acupuntura.....	36
1.3.1 Acupuntura e osteoporose.....	39
2.0 Capítulo II: Descrição de um modelo de protocolo experimental de anestesia parenteral e analgesia para procedimentos cirúrgicos invasivos em ratos.....	40
2.1 Introdução.....	40
2.2 Objetivos	42
2.3 Justificativa.....	42
2.4 Métodos	43

2.4.1	Avaliação clínica do animal	44
2.4.2	Medicação pré-anestésica.....	45
2.4.3	Anestesia	45
2.4.4	Analgesia pós-operatória	48
2.5	Protocolo anestésico em ratos.....	49
2.6	Considerações finais.....	54
3.	Capítulo III: Descrição de um método de Ovário-salpingo-histerectomia em ratas como modelo para indução de osteoporose pós-menopáusia.....	56
3.1	Introdução.....	56
3.2	Métodos	58
3.2.1	Pré-operatório.....	58
3.5	Resultados.....	65
3.5.1	Duração da cirurgia	66
3.5.2	Taxa de mortalidade.....	66
3.5.3	Tempo de cicatrização da ferida	66
3.5.4	Complicações.....	66
3.6	Discussão.....	68
3.7	Conclusão	70
4.0	Capítulo IV: Interferência da acupuntura e da administração de 17 beta-estradiol na massa corporal de ratas submetidas a Ovário-salpingo-histerectomia.....	70
4.1	Introdução.....	70
4.2	Objetivos	73
4.3	Justificativa.....	73
4.4	Métodos	74
4.4.1	Delineamento experimental	74
4.4.2	Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	76
4.4.3	Reposição hormonal de 17 beta-estradiol (RH).....	76
4.4.4	Procedimento de acupuntura	77
4.4.5	Análise estatística.....	86
4.5	Resultados	87
4.6	Discussão.....	90
4.6	Conclusão	91
4.7	Perspectivas futuras.....	92
	Referências:.....	93
	ANEXO A – Comprovante de submissão e aprovação do comitê de ética animal.....	105

INTRODUÇÃO GERAL:

A osteoporose é definida como uma doença do esqueleto caracterizada pelo comprometimento da resistência e da qualidade óssea, o que predispõe a um risco aumentado de fraturas. Esse distúrbio esquelético debilitante é responsável pela maioria das fraturas vertebrais e do quadril em mulheres na pós-menopausa. A causa deste transtorno é principalmente genética, mas também pode ser de escolhas de estilo de vida, hormônios, drogas, medicamentos e nutrição. Várias condições, como envelhecimento, sexo, período de amenorréia, história parental de fratura, ingestão de cálcio na dieta, deficiência de vitamina D, baixo índice de massa corporal (IMC), atividade física reduzida e função tireoidiana são considerados como fatores associados a mudanças de densidade mineral óssea em idosos (TIAN e colab., 2017). A prevalência relatada de osteoporose em mulheres foi de 9% no Reino Unido, 15% na França e Alemanha, 16% nos EUA e 38% no Japão. No Brasil ainda não temos dados estatísticos sobre a real incidência da doença.

A Medicina, assim como as demais profissões, está em constante mudança. Na busca do aperfeiçoamento tanto do diagnóstico quanto das modalidades terapêuticas, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) tem sido utilizada e estudada por profissionais ocidentais, como forma complementar na aplicação da Medicina Ocidental. A introdução da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS demonstrou um grande interesse do Ministério da Saúde em incorporar e implementar a Acupuntura no Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS). Como a acupuntura tem baixa incidência de efeitos colaterais e tem a capacidade de levar a efeitos sistêmicos, não apenas na remodelação óssea, ela se enquadra como terapia potencialmente interessante para o tratamento das desordens endócrinas.

A acupuntura, uma terapia tradicional originária da China, tem sido gradualmente aceita como uma terapia alternativa e complementar pela comunidade médica ocidental por sua eficácia inegável para dor e doenças crônicas. (QIU e colab., 2016). Tal terapia tem como objetivo prevenir e curar doenças pela estimulação de acupontos específicos de acordo com a teoria dos meridianos de acupuntura e a teoria do "Qi" (energia). Existem diferentes maneiras de estimular o acuponto, como agulhamento, eletroacupuntura, estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) e moxabustão. Cada acuponto tem suas próprias funções terapêuticas específicas, e a

prescrição do ponto de acupuntura é formulada por diferentes pontos de acupuntura e modos especiais de estímulo baseados na antiga teoria da medicina chinesa. (GUO e colab., 2016).

Diante do exposto, torna-se importante o estabelecimento de um modelo animal para melhor compreender os efeitos e os mecanismos de ação fisiológicos da acupuntura no tratamento da osteoporose pós-menopausica. Para tanto, foi utilizado um modelo de ratas com menopausa induzida cirurgicamente para a realização da técnica de acupuntura experimental e de sua avaliação na mudança da massa corporal, em relação ao tratamento com 17 beta-estradiol. Torna-se também, de suma relevância avaliar a viabilidade da utilização do modelo murino na terapêutica com a acupuntura, bem como avaliar as alterações nos marcadores inflamatórios de reabsorção e formação óssea.

OBJETIVOS GERAIS:

- Descrever um protocolo experimental de analgesia e anestesia para procedimentos cirúrgicos invasivos em ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar).
- Descrever um protocolo experimental cirúrgico de ovário-salpingo-histerectomia em ratas (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar).
- Descrever um protocolo experimental de contenção e aplicação de acupuntura em ratas (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar).
- Criação de aparato para a realização de acupuntura em modelo murino.
- Analisar a interferência da acupuntura e da administração de 17 beta-estradiol na massa corporal de ratas (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) submetidas a ovário-salpingo-histerectomia.
- Realizar a documentação fotográfica e por filmagem de todos os procedimentos descritos.

JUSTIFICATIVA:

A osteoporose é uma doença muito prevalente na população mundial, sobretudo nas mulheres após a menopausa. Com base nisso e afim de contribuir nas pesquisas experimentais dessa desordem o presente trabalho tem uma relevante função ao

descrever técnicas para a indução dessa condição em um modelo animal e também ao descrever uma forma de realização de tratamento com Acupuntura, com base na medicina complementar.

O modelo de ratas ovariectomizadas ou ooforectomizadas é considerado padrão ouro para a indução de menopausa experimental nas ratas (KHARODE e colab., 2008). O presente trabalho optou por propor uma variação desse modelo, que é o de ratas ovário-salpingo-histerectomizadas. Enquanto no modelo de ratas ovariectomizadas ocorre a remoção cirúrgica apenas dos ovários, no modelo proposto ocorre a remoção cirúrgica dos ovários, tubas uterinas e útero. Ambos modelos experimentais requerem que os animais passem por uma cirurgia de grau de invasividade 3 segundo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Esse grau de invasividade é compatível com experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária. Para isso os animais precisam ser medicados com analgésicos e passarem por anestesia.

Diversos manuais descrevem uma ampla categoria de drogas que podem ser utilizadas para realizar analgesia e anestesia nesses animais, porém as doses recomendadas são muito amplas e poucos estudos descrevem de forma detalhada qual seria uma combinação ideal desses fármacos para a realização de anestesia e analgesia pela via parenteral para a realização de procedimentos cirúrgicos invasivos em modelo murino. Diante disso, torna-se de extrema relevância o estabelecimento de um protocolo padrão que possa ser seguido, assim como a demonstração desses experimentos por meio de vídeos e fotografias, que mostram de forma clara e didática todos os passos envolvidos em sua execução.

Dessa forma, a descrição de um protocolo de anestesia e analgesia se justifica pois poderá auxiliar outros pesquisadores em seus experimentos que necessitam da realização de procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados a realizarem seus experimentos respeitando os princípios de “redução, substituição e refinamento” no uso de animais, conhecido como Princípio dos 3R’s (RUSSELL e BURCH, 1959). Tal trabalho é importante, pois promove a redução do uso de animais ao compartilhá-los em diferentes estudos científicos e contribui também para o refinamento dos protocolos experimentais, afim de reduzir o estresse, a dor e aprimorar a utilização adequada de anestésicos e analgésicos, em dosagens mais seguras, bem

como incentivada e promove a realização de cirurgias mais seguras e evita mortes desnecessárias dos animais.

A proposta desse protocolo de analgesia e anestesia para procedimentos com esse grau de invasividade e da proposta do protocolo cirúrgico de Ovário-salpingo-histerectomia em ratas é relevante também pois se adequa às orientações que constam na Resolução Normativa número 39, de 29 de Junho de 2018 e Resolução Normativa número 47, de 01 de Outubro de 2020, mais precisamente no capítulo que trata do planejamento cirúrgico (“RESOLUÇÃO Nº 47, DE 1º DE OUTUBRO DE 2020 - RESOLUÇÃO Nº 47, DE 1º DE OUTUBRO DE 2020 - DOU - Imprensa Nacional”, [S.d.]; “RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 39, DE 20 DE JUNHO DE 2018 - Imprensa Nacional”, [S.d.]).

A descrição de uma técnica de acupuntura experimental e de sua avaliação na mudança da massa corporal das ratas com menopausa induzida cirurgicamente, em relação ao tratamento com 17 beta-estradiol, são relevantes, pois o índice de massa corporal está diretamente relacionado com o risco de osteoporose em mulheres na menopausa. Além disso, a acupuntura é uma especialidade médica reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina e uma especialidade Médico Veterinária reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, além disso, a acupuntura faz parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro. Dessa forma a acupuntura é uma prática terapêutica tanto em animais quanto em seres humanos, com grande potencial de difusão pelo território brasileiro, e de baixo custo.

1. CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Menopausa

A menopausa se trata de um período de transição marcado para muitas mulheres por alterações fisiológicas com potencial modificação na qualidade de vida, sendo a menopausa considerada natural como aquela que ocorre devido à ausência de menstruação por 12 meses sem causa patológica (POTTER e colab., 2018). Os médicos e as mulheres geralmente identificam esse período de transição para a menopausa ao

perceberem o início de ciclos menstruais irregulares ou devido a presença de sintomas vasomotores que ocorrem nessa ocasião (GRACIA e FREEMAN, 2018).

As mulheres costumam experimentar a menopausa em média com 51,4 anos, porém pode variar de acordo com as condições sociais e o tabagismo (SANTORO e colab., 2007). Os sintomas mais comuns da menopausa geralmente se iniciam em um período chamado de transição, a perimenopausa que ocorre em média aos 47 anos ou 4 a 6 anos antes da manifestação da menopausa (BACON, 2017).

Durante essa fase de transição da perimenopausa e menopausa os principais sinais e sintomas que são percebidos pelas mulheres incluem, dentre outros sintomas, o aumento da variação referente a duração do ciclo menstrual, alteração na fertilidade, sintomas vasomotores, alterações do sono, quadros depressivos e ansiosos, alterações urogenitais como ressecamento da mucosa vagina , disfunção sexual e alterações osteoarticulares (POTTER e colab., 2018).

1.1.1 Sangramento durante a perimenopausa:

A perimenopausa é o período no qual as mulheres terão maior chance de apresentarem sangramento uterino anormal. Estima-se que aproximadamente 30% das mulheres irão apresentar essa condição ao longo de suas vidas. Fatores preocupantes em relação ao sangramento uterino anormal, incluem perda sanguínea, dor, diminuição da saúde e da fertilidade, além do aumento nos custos dos serviços de saúde (RAHN e colab., 2011).

As alterações nos padrões de sangramento menstrual sinalizam o início da perimenopausa, porém também tal sangramento é considerado diagnóstico diferencial para outras patologias. Sabe-se que o sangramento uterino anormal é o primeiro sinal de câncer endometrial, portanto a triagem para esta condição é fundamental em uma avaliação de uma paciente com esses sintomas. A *American Cancer Society* estima que são diagnosticadas, todos os anos, cerca de 52000 mulheres com câncer de endométrio nos Estados Unidos (SMITH e colab., 2014).

Com o objetivo de melhor classificar o sangramento uterino anormal, a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia criou um sistema de classificação denominado PALM-COEIN, no qual o acrônimo PALM se refere a causas estruturais e COEIN a causas não estruturais do sangramento uterino anormal (DENERIS, 2016).

Nessa classificação a letra P é para Pólipos; A para Adenomiose; L para Leiomioma, M para Maligna e pré-maligna; C para Coagulopatias; O para disfunção Ovariana; E para disfunção Endometrial; I para Iatrogenia e por fim N para Não classificado de outra forma (DENERIS, 2016).

1.1.2 Alteração na fertilidade e contracepção

As taxas de concepção tendem a diminuir nas mulheres na faixa etária acima dos 40 anos, porém uma gestação não planejada ainda pode ocorrer (POTTER e colab., 2018). Métodos contraceptivos ainda são recomendados para mulheres com idade superior aos 44 anos, caso desejem evitar uma gestação (CURTIS e colab., 2016). Tais métodos são de grande importância nessa fase da vida, sobretudo devido a maior possibilidade de complicações maternas durante uma gestação nesse período e também devido a maior ocorrência de anomalias cromossômicas fetais e abortamentos espontâneos. O risco relativo de mortalidade materna aumenta de próximo a 1 até os 30 anos para 4,9 dos 35-40 anos, para 8,3 dos 40-44 anos e 22,2 a partir dos 45 anos. A possibilidade de anomalias cromossômicas é de 1/192 aos 35 anos; 1/66 aos 40 anos; 1/21 aos 45 anos e 1/10 aos 48 anos (NORMAS MANUAIS TÉCNICOS SÉRIE DIREITOS SEXUAIS DIREITOS REPRODUTIVOS -CADERNO, 2008).

As principais condições patológicas relacionadas à gravidez nesta faixa etária incluem a doença hipertensa específica da gravidez; o diabetes gestacional; prematuridade; rotura prematura das membranas gestacionais; placenta prévia e descolamento prematuro de placenta; crescimento intraútero retardado e sofrimento fetal (NORMAS MANUAIS TÉCNICOS SÉRIE DIREITOS SEXUAIS DIREITOS REPRODUTIVOS -CADERNO, 2008).

A utilização de métodos contraceptivos são aconselhados até 12 meses após o término das menstruações (PINKERTON e colab., 2017). Contudo, nas mulheres que fazem uso de métodos contraceptivos hormonais a amenorreia não é um marcador eficaz para indicar a falência da função ovariana e sabe-se que os outros sintomas também podem não ser percebidos. Dessa forma para mulheres com idade acima de 50 anos e que estiverem em uso de contraceptivos a base de progestogênio apenas, a dosagem de hormônio folículo-estimulante pode ser usada para auxiliar no diagnóstico da menopausa (“Overview | Menopause: diagnosis and management | Guidance |

NICE”, [S.d.]). Contudo não há testes laboratoriais confiáveis disponíveis para confirmar a perda definitiva de fertilidade em uma mulher, a avaliação dos níveis de hormônio folículo-estimulante para determinar quando uma mulher não é mais fértil pode não ser precisa (CURTIS e colab., 2016).

Dentre as principais opções disponíveis de métodos contraceptivos durante a perimenopausa pode-se citar o dispositivo intrauterino de levonorgestrel, dispositivo intrauterino de cobre, implante contraceptivo, acetato de medroxiprogesterona de depósito, contracepção hormonal combinada, pílula apenas de progestogênio, métodos de barreira, contracepção permanente masculina e feminina, contracepção de emergência (PRACTITIONERS, [S.d.]).

Nenhum método contraceptivo é contraindicado apenas com base na idade. No entanto, como a idade é um fator de risco para doenças vasculares e metabólicas, a contracepção hormonal combinada e o acetato de medroxiprogesterona de depósito não devem ser prescritos na primeira intenção. O dispositivo intrauterino de cobre e os contraceptivos exclusivos de progestágeno (pílula, implante, dispositivo intrauterino) devem ser considerados principalmente, pois oferecem maior eficácia com riscos menores (LAMBERT e colab., 2018).

O dispositivo intrauterino de levonorgestrel pode ser utilizado na maioria das mulheres para promover cinco anos de alta efetividade contraceptiva. Tal método contraceptivo leva a uma redução significativa no sangramento menstrual, além de não apresentar interações medicamentosas e poucas contraindicações (KAUNITZ e INKI, 2012). As únicas contraindicações absolutas são gravidez conhecida ou suspeita, sangramento uterino anormal inexplicado, cervicite atual, endometrite ou doença inflamatória pélvica ou carcinoma cervical ou endometrial. Mulheres com cavidades uterinas distorcidas por qualquer processo (cicatrizes, leiomioma) que impossibilitem a colocação do dispositivo ou que tornem a cavidade endometrial excessivamente grande também são identificadas como fracas candidatas a utilização. O câncer de mama nos últimos cinco anos também é uma contraindicação ao uso (NELSON, 2017).

Apesar das consideráveis contraindicações para as pacientes com um passado de câncer de mama, em mulheres nessa situação e que fazem uso de tamoxifeno podem ser beneficiadas pelo dispositivo intrauterino de levonorgestrel como estratégia para prevenção de hiperplasia e pólipos endometriais que podem vir a surgir em decorrência de tal medicamento (DOMINICK e colab., 2015).

Os dispositivos intrauterinos de cobre, do tipo de cinco ou de dez anos, fornecem contracepção altamente eficaz sem efeitos colaterais ou riscos hormonais e podem ser usados por mulheres nas quais os hormônios são contraindicados (PRACTITIONERS, [S.d.]).

O implante contraceptivo de etonogestrel exclusivo para progestogênio pode ser usado até a menopausa e tem poucas contraindicações. O risco de câncer de mama é um ponto controverso dentre os estudos científicos. Tal implante está associado a efeitos metabólicos inexistentes ou clinicamente insignificantes e a nenhuma redução significativa na densidade óssea (BITZER, 2019).

A pílula exclusiva para progestágeno é mais eficaz para mulheres com idade superior a quarenta 40 anos do que para mulheres mais jovens. As pílulas de baixa dose de progesterona trabalham principalmente pelo espessamento do muco cervical e têm uma janela de três horas a ser tomada diariamente. Acredita-se que as pílulas de progesterona produzam efeitos metabólicos inexistentes ou insignificantes, mas podem causar um controle inadequado do ciclo, o que pode exigir investigação para excluir patologia nessa faixa etária. A amenorreia não pode ser usada como um indicador da menopausa naquelas que usam tal método (PRACTITIONERS, [S.d.]).

A contracepção para mulheres acima de 40 anos não deve ser posta de lado. A contracepção reversível de ação prolongada e a pílula somente de progestágeno devem ser prescritas como primeiro medicamento. A contracepção não é mais necessária para mulheres acima de 50 anos que usam contracepção não hormonal, após 12 meses de amenorréia. Os pacientes tratados com contracepção hormonal combinada devem parar de usá-lo acima de 50 anos. Não é recomendável medir os níveis hormonais durante o uso de contracepção hormonal. Um intervalo livre de contracepção hormonal deve ser considerado, enquanto se usa o método contraceptivo de barreira. Se uma atividade ovariana persistir, deve-se reestabelecer uma contracepção não hormonal ou apenas uma progesterona exceto acetato de medroxiprogesterona de depósito (LAMBERT e colab., 2018).

Por fim, a decisão de uma mulher de interromper a contracepção quando a fertilidade é baixa é uma decisão pessoal e individual. Embora a menopausa possa ser assumida na maioria das mulheres com 55 anos de idade, é necessário cuidado para mulheres com histórico familiar de menopausa tardia ou ausência de sintomas da

menopausa. O papel do clínico geral é fornecer informações para apoiar uma escolha informada.

1.1.3 Sintomas vasomotores

Os sintomas vasomotores, como ondas de calor, sudorese noturna, distúrbio do sono e fadiga compõem os sintomas mais comuns da menopausa. Mais de 50% das mulheres na meia idade experienciam tais sintomas, sendo que as mulheres que apresentam sintomas vasomotores com frequência tendem a tê-los por aproximadamente 7,4 anos e persistem por aproximadamente 4,5 anos após o fim do período menstrual (AVIS e colab., 2015a).

Tais sintomas são resultantes da deficiência estrogênica durante o período da menopausa e perimenopausa e exercem, frequentemente, efeitos negativos na qualidade de vida e na saúde das mulheres. Os sintomas vasomotores são também associados a múltiplos indicadores de aumento do risco cardiovascular e aumento da perda óssea (AVIS e colab., 2018).

A causa das ondas de calor não é totalmente compreendida e é provavelmente multifatorial. Pensa-se geralmente que os fogachos resultam de um estreitamento da zona termoneutra em mulheres na perimenopausa (FREEDMAN, 2014). Os hormônios reprodutivos desempenham um papel importante nesse estreitamento, uma vez que o surgimento dos sintomas vasomotores corresponde com as alterações nos hormônios reprodutivos no momento de transição da menopausa e o efeito terapêutico da reposição hormonal provoca a regressão de tais sintomas nesse período. Embora níveis mais baixos de estrogênio e níveis superiores de hormônio folículo estimulante estejam associados a essa sintomatologia, nem todas as mulheres que sofrem alterações hormonais têm tais sintomas vasomotores (STURDEE e colab., 2017).

Por sua vez, foi constatada uma associação mais forte entre os fogachos e o aumento nos níveis do hormônio folículo estimulante do que em relação a queda estrogênica (RANDOLPH e colab., 2005). Porém, tanto as alterações nos níveis hormonais quanto a mudança no ciclo menstrual não são suficientes para explicar completamente a prevalência de tais sintomas vasomotores, o que leva a acreditar que outros fatores, como estilo de vida e características psicossociais têm importante correlação com tais manifestações (AVIS e colab., 2001).

Apesar de a dificuldade em concentração, o mau humor e os episódios depressivos ocorram frequentemente de forma concomitante ao período no qual as mulheres vivenciam a menopausa, tais sintomas ainda não possuem correlação direta com a menopausa. Os sintomas vasomotores são os únicos que possuem clara associação a esse período da vida reprodutiva feminina (AVIS e colab., 2001; HARLOW e colab., 2012).

Diversas pesquisas foram realizadas utilizando uma vasta lista de sintomas, com o objetivo de reunir em um único grupo vários sintomas que não possuíam ligação natural entre si. Foi observado que as ondas de calor e suores noturnos não estão correlacionados constantemente com os demais sintomas (AVIS e colab., 2001; CRAY e colab., 2012; HARLOW e colab., 2017). Além disso, foi concluído que os demais sintomas não acompanham de perto o ciclo menstrual ou endócrino durante a transição da menopausa (HARLOW e colab., 2012).

Os principais sintomas incluídos nos questionários de pesquisa foram: Sensação de tontura ou desmaio; sentimento de cansaço ou falta de energia; pressão ou aperto na cabeça ou no corpo; pouco apetite; coração batendo rápida ou fortemente; inquietude ou nervosismo; memória insuficiente; preocupar-se desnecessariamente; dores musculares, dores ou reumatismo; sentir-se tensa ou volumosa; sentir as partes do corpo dormentes ou com formigamento; sentir-se irritável; perda de interesse na maioria das coisas; sentir-se infeliz ou deprimida; ataques de pânico; pobre concentração; sono perturbado; ondas de calor e sudorese; sentir-se excitável; ganho de peso; apresentar dores na nuca e no crânio; mãos e pés frios; crises de choro; dores no peito; obstipação ou diarreia; sensação de insetos rastejando sobre a pele; dores de cabeça; pontos cegos diante dos olhos; sentimentos de asfixia (GREENE, 1976).

Para as mulheres durante a transição natural da menopausa, aquela que não ocorre devido à histerectomia / ooforectomia ou outra intervenção médica, a ocorrência de sintomas vasomotores varia muito de acordo com o estágio da transição. A ocorrência é menor antes do período de transição, aumenta no período de transição precoce culminando em uma prevalência ainda maior no período de transição tardia, próximo ao período menstrual final. Tal incidência também ocorre de forma semelhante a gravidade dos sintomas, sendo os sintomas mais graves mais frequentes quanto mais a mulher se aproxima do período menstrual final, sendo uma prevalência de pico de 50% nessa fase. Os padrões para sintomas vasomotores graves, foram definidos pelos estudos

de acordo com a frequência ou incômodo mais elevados. Já na pós-menopausa, os sintomas vasomotores ocorrem em até 3 em cada 4 mulheres, nos primeiros dois anos após o período menstrual final e diminui lentamente depois, levando de 8 a 10 anos para retornar aos níveis imediatamente anteriores (FREEMAN e colab., 2014; POLITI e colab., 2008; WILLIAMS e colab., 2008).

No geral, cerca de metade das mulheres sintomáticas relatam apenas severidade ou incômodo leve. Em média, as pacientes relatam quatro a cinco ondas de calor por dia, podendo chegar a até vinte episódios diariamente e uma em cada quatro mulheres relatam ter sintomas vasomotores diariamente. Uma maior frequência de sintomas vasomotores também está ligada a um incômodo maior. As ondas de calor diurnas são relatadas com mais frequência do que as noturnas, embora isso possa refletir dificuldade em perceber ou registrar os sintomas noturnos. Apesar de geralmente, a sudorese noturna ser considerada mais incômoda do que os sintomas diurnos (SIEVERT, 2013; THURSTON e colab., 2008).

A terapia hormonal na menopausa é considerada uma medida altamente eficaz para o controle dos sintomas vasomotores, embora os mesmos frequentemente retornem após a descontinuação da terapia. Tem se demonstrado que a interrupção do tratamento com reposição hormonal leva a recorrência dos sintomas vasomotores, sendo estes ainda mais severos em dois terços das mulheres e mais recorrentes nas pacientes que já apresentavam tal sintomatologia anteriormente ao início da terapia. As mulheres previamente assintomáticas também apresentarem chances de passarem a manifestar tais sintomas após a descontinuidade da terapia, apesar de ocorrer com menor frequência (BACON, 2017; GENTRY-MAHARAJ e colab., 2015; PINKERTON e colab., 2017).

Ao se analisar os comportamentos relacionados a saúde, fatores sociodemográficos e características psicossociais de diversas mulheres durante a perimenopausa, foram encontrados alguns fatores de risco para os sintomas vasomotores. O principal fator de risco encontrado foi o tabagismo. O fumo ativo e a exposição passiva à fumaça estão relacionados a uma maior probabilidade de desenvolvimento e agravamento dos sintomas vasomotores. Os fumantes atuais têm uma probabilidade mais de 60% maior de desenvolverem os sintomas, ajustando-se mesmo a fatores de confusão, como educação e raça / etnia (GOLD e colab., 2004). Além do tabagismo, os sintomas depressivos, a ansiedade e o estresse também estão

fortemente associados a uma maior duração dos sintomas vasomotores (AVIS e colab., 2015b).

As demais correlações possíveis como a alimentação, o índice de massa corporal, nível de atividade física e consumo de álcool em relação aos sintomas vasomotores ainda não estão completamente elucidadas. Os estudos ainda encontram resultados conflitantes e inconsistentes com diversos fatores de confusão, como grau de instrução, raça/ etnia e comorbidades (AVIS e colab., 2018).

1.1.4 Sintomas geniturinários e sexuais

A síndrome geniturinária da menopausa é definida como um conjunto de achados clínicos e sintomas incômodos associados à deficiência de estrógeno com envolvimento de alterações nos lábios vaginais, introito, clitóris, vagina, uretra e bexiga (SHIFREN, 2018).

A síndrome geniturinária da menopausa é uma condição crônica e progressiva e dificilmente se resolve sem tratamento, afeta aproximadamente 50% das mulheres após a menopausa e também pode ocorrer em outras ocasiões devido à baixa de estrógeno, como no pós-parto, durante a lactação e com o uso de algumas medicações (“Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of the North American Menopause Society”, 2013). O diagnóstico é clínico e exames laboratoriais são geralmente desnecessários. Os sintomas geniturinários geralmente estão presentes após a menopausa e incluem ressecamento vaginal, dispareunia, prurido e queimação vulvar, disúria, aumento da frequência e urgência urinária e infecções recorrentes do trato urinário inferior (PARISH e colab., 2013). Para algumas mulheres, os sintomas podem ser severos o bastante para impedir a atividade sexual com penetração e chega a causar desconforto mesmo para sentar-se ou para realizar a higiene íntima (SHIFREN, 2018).

As alterações encontradas no exame físico incluem redução dos pelos pubianos, perda do coxim adiposo labial, adelgaçamento dos pequenos lábios, estreitamento do introito e aumento do pH vaginal (“Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of the North American Menopause Society”, 2013). As alterações do exame ginecológico interno incluem calibre vaginal reduzido, mucosa lisa, brilhante e pálida com perda de dobras, o colo do útero geralmente apresenta-se

nivelado com a abóbada vaginal. Um exame pélvico costuma ser recomendado para excluir outras condições que podem apresentar sinais e sintomas semelhantes, como a vaginite irritante infecciosa ou inflamatória; dermatoses e neoplasia (“Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of the North American Menopause Society”, 2013).

Os fatores de risco para a síndrome geniturinária da menopausa incluem, além da própria menopausa em si, o hipoestrogenismo não correlato à menopausa, ooforectomia bilateral, tabagismo, consumo abusivo de álcool, frequência da prática sexual reduzida ou abstinência, falência ovariana, falta da prática de exercícios físicos e ausência de parto vaginal (GANDHI e colab., 2016).

Como a genitália feminina e o trato urinário inferior possuem origem embriológica comum, uma vez que durante o desenvolvimento embriológico feminino, o seio urogenital, os dutos de Müller e o tubérculo de Müller formam o vestíbulo vaginal e o quinto inferior da vagina, bexiga urinária, trígono e toda a uretra. Os ductos mullerianos fundidos formam o útero e os quatro quintos superiores da vagina. Devido a essa origem embriológica comum, a genitália e o trato urinário inferior compartilham a função comum do receptor de estrogênio (GANDHI e colab., 2016). Dessa forma, os efeitos do hipoestrogenismo causam alterações vulvovaginais e urológicas, uma vez que os receptores do tecido urogenital necessitam dos níveis do estrogênio endógeno para manter sua fisiologia normal (GOLDSTEIN, 2010).

Os estrogênios produzidos pelos ovários são estradiol, estrona e estriol, sendo que o estradiol é o mais abundante nas mulheres antes da menopausa. Durante os anos de transição entre a perimenopausa e a pós-menopausa, a estrona, uma forma menos potente do estrogênio, se torna predominante (GANDHI e colab., 2016). Durante a pós-menopausa, o número de receptores de estrogênio diminui gradualmente, porém continuam presentes por toda a vida da mulher. No entanto, na presença de administração exógena de estrogênio, esse número de receptores de estrogênio pode voltar a crescer (CAVALLINI e colab., 2008).

Embora o declínio do estrogênio influencie diretamente a condição do epitélio geniturinário no período da menopausa, o estado dos receptores neste tecido ainda é pouco compreendido (CAVALLINI e colab., 2008). Sabe-se que pelo menos 2 isoformas dos receptores estrogênicos existem, a isoforma alfa e a isoforma beta, e que diferentes ligantes de esteroides alteram de forma diferente as respostas gênicas

induzidas por essas isoformas do receptor (KUIPER e colab., 1997). Além disso, o complexo ligante / receptor resultante não é reconhecido da mesma maneira por todas as células, devido em parte ao padrão de genes ativos e co-reguladores do receptor de esteroide, que modulam o receptor estrogênico para a regulação da expressão gênica. Isso auxilia na explicação de como diferentes ligantes dos receptores estrogênicos manifestam diferentes respostas nos mesmos tipos de células e como o mesmo ligante causa respostas diferentes em diferentes tipos de células (GEBHART e colab., 2001).

O conhecimento das isoformas do receptor presentes e sua resposta ao estrogênio pode ajudar a melhorar a compreensão do efeito do estrogênio nos tecidos geniturinários femininos e pode levar a terapias direcionadas para as doenças que acometem tais tecidos (CAVALLINI e colab., 2008). No tecido vulvovaginal, a isoforma alfa do receptor de estrogênio está predominantemente presente em mulheres na pré e pós-menopausa, enquanto a isoforma beta parece ser expresso apenas em mulheres na pré-menopausa. O estado da menopausa está associado a um declínio dramático na expressão da isoforma beta, independentemente do uso de estrógeno exógeno, enquanto a expressão da isoforma alfa é preservada (GEBHART e colab., 2001).

A educação é importante para que as mulheres conheçam as alterações geniturinárias que ocorrem com a perda de estrogênio associada à menopausa. Os pacientes devem ser avisados de que é improvável que os sintomas da síndrome geniturinária da menopausa melhorem sem tratamento, e o aconselhamento deve incluir uma revisão das opções de tratamento, não hormonais e hormonais. As mulheres que são sexualmente ativas costumam estar cientes dessas mudanças graduais, que podem causar desconforto com a atividade sexual, mas as mulheres sexualmente inativas que têm a síndrome geniturinária da menopausa e que retomam a atividade sexual podem se surpreender ao ser dolorosa (ou nem mesmo possível). A atividade sexual indolor pode ajudar a manter a saúde vaginal. Fisioterapia do assoalho pélvico, idealmente fornecida por um fisioterapeuta com treinamento especializado em distúrbios do assoalho pélvico, pode ser útil para o tratamento de mulheres com disfunção muscular do assoalho (FAUBION e colab., 2012, 2017).

1.1.5 Alterações cognitivas e do humor

Sabe-se que o estrogênio promove o crescimento neuronal, favorece sua sobrevivência e atua no sistema colinérgico, que está intimamente ligado ao funcionamento cognitivo, particularmente a memória (GIBBS e AGGARWAL, 1998; SHERWIN e MCGILL, 2003). A diminuição do estrogênio em torno da menopausa pode ser associada a declínios no funcionamento cognitivo, bem como aumento do risco de sintomas depressivos e transtornos depressivos (LUINE, 2014). O estrogênio também desempenha um papel nos sistemas de neurotransmissores envolvido na depressão, uma vez que atua como um agonista / modulador serotoninérgico, aumentando a síntese e a captação do local de ligação do receptor em modelos animais e nas mulheres na pós-menopausa (WEBER e colab., 2014). A terapia com estrogênio melhora o humor nas mulheres com depressão relacionada à perimenopausa, assim como naquelas mulheres que entraram na menopausa devido a remoção cirúrgica dos ovários (WEBER e colab., 2014).

Foi observado após uma revisão sistemática com metanálise, que os estágios de peri e pós-menopausa estão associados a uma pior performance em testes de memória verbal em comparação com a pré-menopausa. Além disso, o estágio pós-menopausa está associado a diminuições da fluência verbal fonêmica em comparação com a perimenopausa. Os autores dessa revisão também sugerem que as mulheres têm um risco significativamente maior de desenvolver depressão nos estágios da peri e pós-menopausa do que na pré-menopausa (WEBER e colab., 2014).

A transição da menopausa é um momento de maior vulnerabilidade aos declínios cognitivos e maior risco de sintomas depressivos e transtornos depressivos, no entanto, a perimenopausa associa-se frequentemente a eventos sociais e emocionais, com impacto na sintomatologia psicológica como, eventuais dificuldades relacionais do casal, filhos a deixarem o lar, alteração de responsabilidade no emprego, doença ou morte de familiar (BACON, 2017).

1.1.6 Perturbações do sono

O sono é um estado fisiológico que com a idade se deteriora e é observado uma diminuição progressiva da sua quantidade e qualidade. De forma secundária às alterações hormonais, durante a menopausa, os distúrbios do sono ocorrem com frequência ou se agravam e podem estar relacionados a diversos distúrbios associados.

Os distúrbios do sono são frequentes em mulheres na menopausa, eles podem ser primários ou provocados por ondas de calor, transtornos do humor, condições médicas, fatores psicossociais ou transtornos intrínsecos do sono, como como a apneia obstrutiva do sono ou a síndrome das pernas inquietas (BRUYNEEL, 2015; LORD e colab., 2014).

1.1.7 Alterações cardiovasculares e metabólicas

Os distúrbios metabólicos mais comuns na menopausa incluem dislipidemia, baixa tolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e diabetes mellitus tipo 2. O declínio do estradiol após a transição da menopausa deixa a vasculatura vulnerável aos fatores de risco de doenças cardiovasculares, como os lipídios (MATTHEWS e colab., 2009; STACHOWIAK e colab., 2015).

A incidência de doença cardiovascular aumenta consideravelmente, sendo a principal causa de morte na pós-menopausa, juntamente com doença cerebrovascular, doença arterial periférica, claudicação intermitente e aneurismas da aorta. Acredita-se que o aumento do risco cardiovascular está correlacionado a maior prevalência da síndrome metabólica após a menopausa, a qual consiste em obesidade visceral, dislipidemia, hipertensão arterial e alterações do metabolismo glicídico (MATTHEWS e colab., 2009; MENDES e colab., 2012; STACHOWIAK e colab., 2015).

A dislipidemia na menopausa é caracterizada por um aumento nos níveis de lipoproteína de baixa densidade e um declínio nos níveis de lipoproteína de alta densidade. Essas alterações têm um impacto negativo no sistema cardiovascular, acelerando o desenvolvimento da aterosclerose (MATTHEWS e colab., 2009).

O período da menopausa requer uma atenção especial em relação ao diabetes mellitus, uma vez que nesse período uma série de sintomas são comumente relatados, como mudança no peso corporal (aumento ou perda significativa), poliúria, inflamação urogenital recorrente, fadiga, fraqueza, irritabilidade, visão turva, sede, aumento do apetite, disfunção sexual, os quais podem apontar não para síndromes climatéricas como também para distúrbios de carboidratos na forma de diabetes mellitus tipo 2 não insulino dependente (CLARK, Nathaniel G. e colab., 2007). Outros fatores de risco para diabetes mellitus tipo 2 na menopausa incluem obesidade, baixa atividade física, dieta pobre, fumo, álcool (em excesso) e certos medicamentos. Além disso, o metabolismo

prejudicado da vitamina D3 e a deficiência de cálcio (característico na pós-menopausa) se traduzem em um risco aumentado de ambos os tipos de diabetes - diabetes mellitus tipo 1 e diabetes mellitus tipo 2 (PETERLIK e CROSS, 2009; STACHOWIAK e colab., 2015).

Após a menopausa, a incidência de obesidade aumenta, incluindo a obesidade visceral (androide). Essa distribuição de gordura promove a ocorrência de uma série de distúrbios metabólicos, incluindo a síndrome metabólica e uma maior chance de desenvolvimento da aterosclerose. A comparação de pacientes com índice de massa corporal normal e aquelas com o índice alto mostrou que o índice de massa corporal elevado ($> 30 \text{ kg} / \text{m}^2$) teve um efeito negativo significativo sobre a pressão arterial e também afetou de forma negativa e significativamente os níveis de triglicérides e glicose em jejum. Tais índices estavam significativamente relacionados a níveis baixos de lipoproteína de alta densidade, portanto, com fatores de risco para doenças cardiovasculares (BAGNOLI e colab., 2014).

As células adiposas intra-abdominais produzem várias substâncias com impacto nas respostas inflamatórias, na resistência à insulina e no aumento do risco de doenças cardiovasculares. Algumas moléculas, sintetizadas diretamente pelos adipócitos, são chamadas de adipocinas, nesse grupo estão incluídas as adipocitocinas, como leptina, adiponectina, resistina, grelina, as quais controlam o balanço energético o apetite e influenciam a sensibilidade à insulina via mecanismos endócrinos. Tais moléculas também modulam o tamanho e número de adipócitos e a angiogênese via mecanismos parácrinos, exercendo assim um papel importante na regulação da massa gorda (WAKI e TONTONOZ, 2007). Mulheres na menopausa são caracterizadas por níveis elevados de leptina e resistina e níveis diminuídos de adiponectina e grelina (leptina "alta" juntamente com adiponectina "baixa" mostram uma correlação positiva com marcadores de resistência à insulina). Na pós-menopausa, o excesso de gordura também resultará em um aumento na produção de estrogênio endógeno, resultante da ocorrência de aromatização extra glandular in situ (STACHOWIAK e colab., 2015).

1.1.8 Alterações osteoarticulares na menopausa

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela diminuição da resistência óssea com risco de fratura ao cair da própria altura do corpo (fratura por

fragilidade). A resistência óssea é determinada por uma combinação de densidade e integridade da microarquitetura óssea. A osteoporose pós-menopausa resulta de uma falha em atingir o pico de densidade óssea, perda óssea acelerada após a menopausa, perda óssea relacionada à idade ou uma combinação de fatores. A perda óssea acelerada na pós-menopausa é induzida pela privação de estrogênio. Embora a saúde esquelética seja uma função da predisposição genética, ela pode ser modificada por fatores de estilo de vida, como dieta, exercícios de sustentação de peso e evitar substâncias tóxicas para os ossos (BABER e colab., 2016; JOHANNES DE VILLIERS, 2009). A osteoporose após a menopausa será tratada de forma mais aprofundada em outro tópico.

Osteoartrite é um processo inflamatório e degenerativo articular que evolui de maneira progressiva. Embora nenhuma associação clara tenha sido encontrada entre a exposição ao estrogênio ao longo da vida e o risco de osteoartrite, dores articulares generalizadas estão entre os sintomas mais comuns experimentados por mulheres na menopausa. A prevalência e a incidência de osteoartrite aumentam com a idade e as mulheres correm um risco maior do que os homens, o que apoia a noção de que os hormônios sexuais estão relacionados à incidência de tal condição. Além disso, a artrite em mulheres tem maior probabilidade de ser progressiva e sintomática (BABER e colab., 2016). Os receptores de estrogênio alfa e beta já foram identificados em condrócitos e também em sinoviócitos, além disso já foi observado que o uso do estrogênio leva a efeitos protetores da cartilagem (KARSDAL e colab., 2012).

1.1.9 Alterações do ciclo hormonal

As mulheres perdem a maioria dos folículos nos ovários na vida fetal e essa perda de oócitos continua de forma progressiva e exponencial ao longo da vida reprodutiva feminina, sendo que ocorre uma aceleração da perda de folículos conforme as mulheres entram na transição da menopausa (BLOCK, 1952; FADDY e colab., 1992). Além disso, há evidências de que a qualidade estrutural e funcional dos oócitos se deteriora com o envelhecimento reprodutivo (RICHARDSON, Sandra J. e colab., 1987).

Além das mudanças no número de folículos, que é o principal impulsionador da transição da menopausa, a dinâmica do folículo também muda com o processo da menopausa. As alterações hormonais cardinais reconhecidas como ocorrendo em

conjunto com a irregularidade do ciclo menstrual que anuncia a entrada na transição da menopausa também servem para acelerar o processo de crescimento folicular e podem torná-lo menos eficaz. Finalmente, as alterações nos processos neurais centrais que produzem de forma confiável um pico de hormônio luteinizante ovulatório no meio da vida reprodutiva parecem se tornar menos confiáveis e levar a uma disfunção do ciclo adicional (SANTORO e colab., 2003).

A transição da menopausa é precedida por aproximadamente 35 anos de ciclos menstruais regulares e previsíveis. Durante esse tempo, as mulheres têm um intervalo intermenstrual bem definido de 25 a 35 dias. Esses ciclos consistem em uma fase lútea de 14 dias e uma fase folicular de pelo menos 10 a 11 dias. Antes do aparecimento de uma quebra neste ritmo menstrual característico, o suprimento de ovócitos estava diminuindo, mas ainda não atingiu um nível crítico. No entanto, embora nenhum sinal seja detectável para uma mulher, algumas mudanças hormonais sutis estão acontecendo neste intervalo reprodutivo médio. O hormônio folículo-estimulante, crítico para os estágios terminais do crescimento do folículo, aumenta, embora lentamente, ao longo dos anos reprodutivos (EBBIARY e colab., 1994).

A transição da menopausa pode ser dividida em 2 fases, uma precoce e outra tardia. O início da transição é quando uma mulher que já fazia ciclos menstruais regulares experimenta um salto do ciclo menstrual ou nota uma variação de seu intervalo intermenstrual por mais de 6 dias (HARLOW e colab., 2008). Essa fase precoce permanece até que a mulher passe por um período de amenorreia por mais de 60 dias, que é o critério usado para considerar o período tardio da transição da menopausa, período esse que consiste em amenorréia prolongada e ciclos menos frequentes e termina com o período menstrual final. O período menstrual final é definido apenas após 1 ano de amenorréia. Cada um desses marcos do ciclo menstrual é acompanhado por alterações hormonais que ajudam o médico a determinar o progresso de uma mulher através da transição da menopausa (SANTORO e RANDOLPH, 2011).

Durante o período de transição da menopausa, ocorrem mudanças nas secreções dos hormônios esteróides nas mulheres, devido a alterações nas funções ovarianas. Nesse período de transição, ocorre uma queda na circulação hormonal de estradiol e um aumento na concentração sérica de hormônio folículo estimulante (CHANG e JUDD, 1981). O ovário na pós-menopausa secreta andrógenos, mas virtualmente nenhum estrogênio. Embora o ovário ainda possa conter alguns oócitos, os folículos são

amplamente incapazes de responder às gonadotrofinas e de sintetizar o estradiol. O estrogênio produzido após a menopausa é principalmente da conversão periférica de androgênios adrenais e ocorre no fígado, rim, cérebro, adrenal e tecido adiposo periférico (GASS e REBAR, 2009).

Devido às mudanças na produção de estrogênio, a proporção de estradiol em relação à estrona muda após a menopausa, com o nível de estrona excedendo o do estradiol. Os níveis absolutos de estrogênio são influenciados pelo peso, sexo e idade. Mulheres obesas têm uma concentração mais alta de estradiol livre por causa da diminuição da globulina de ligação do hormônio sexual e um aumento da taxa de aromatização. Eventualmente, há um aumento de 10 a 20 vezes no hormônio folículo estimulante, com um aumento de três vezes no hormônio luteinizante. Os andrógenos continuam a ser produzidos pelas células do estroma ovariano e do hilo em resposta aos níveis elevados de hormônio luteinizante circulante (SANTORO e RANDOLPH, 2011).

1.2 Osteoporose

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com o consequente aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade à fratura (KANIS e colab., 2013). A osteoporose é a doença óssea mais comum em humanos, representando um grande problema de saúde pública. É mais comum em caucasianos, mulheres e idosos. Tal doença esquelética afeta um número enorme de pessoas, de ambos os sexos e todas as raças, e sua prevalência aumenta à medida que a população envelhece. É uma doença silenciosa que geralmente só é percebida pelos pacientes quando as fraturas ocorrem (SÖZEN e colab., 2017). Estima-se que a osteoporose afete 200 milhões de mulheres em todo o mundo, aproximadamente um décimo das mulheres com 60 anos, um quinto das mulheres com 70, dois quintos das mulheres com 80 e dois terços das mulheres com 90 (KANIS, 2007). As fraturas resultantes estão associadas à redução da qualidade de vida e significativa morbidade, mortalidade e utilização de recursos de saúde (KANIS e colab., 2017).

A osteoporose é responsável por mais de 1,5 milhões de fraturas nos Estados Unidos anualmente, incluindo 329.000 fraturas de quadril e é responsável por 17 bilhões de dólares por ano em custos médicos. O risco estimado de ocorrência de

fraturas de quadril, vertebrais ou de punho ao longo da vida, nos países desenvolvidos, se aproxima de 30 a 40%, prevalência semelhante à doença coronariana (JACKSON e MYSIW, 2014; OLSON, 2014).

Os adultos mais velhos são o segmento que mais cresce na população dos Estados Unidos e mesmo que as taxas de fratura de quadril ajustadas por idade permanecem estáveis, ou cheguem a diminuir levemente, modelos sugerem que a incidência anual de fratura de quadril irá crescer de 458.000 a mais de 1 milhão até 2050, com o maior número ocorrendo em mulheres com mais de 65 anos de idade (BROWN e colab., 2012).

Devido aos altos gastos com o tratamento de tal desordem esquelética, programas que busquem a continuidade dos cuidados, estratégias preventivas, adotem uma abordagem multidisciplinar e reabilitação acelerada mostraram ser capazes de reduzir os custos associados às fraturas de quadril. Futuras pesquisas sobre o custo-efetividade das estratégias atuais e os métodos de tratamento médico para o desenvolvimento de novas fraturas provavelmente desempenharão um papel crucial nessas estratégias preventivas. Com a variedade de tratamentos médicos e não médicos sendo usados para prevenir fraturas de quadril, pode ser necessário um protocolo padrão mais econômico (BROWN e colab., 2012).

1.2.1 Osteoporose pós-menopáusia

A osteoporose pós-menopáusia é uma doença crônica e muitas vezes assintomática na maioria das mulheres, o que torna a pesquisa epidemiológica especialmente difícil. A determinação, com precisão, da prevalência de osteoporose é uma tarefa complicada, sobretudo no Brasil, um país grande, com características extremamente diversas de região para região. Nos últimos anos, foram feitos esforços para melhor compreender a epidemiologia da osteoporose pós-menopausa e para mensurar os custos diretos e indiretos da doença para o sistema de saúde brasileiro (BACCARO e colab., 2015).

Dados nacionais indicam que aproximadamente 75% da população brasileira não possui plano de saúde privado e conta com o sistema público de saúde (SUS) (BACCARO e colab., 2015). Além do tratamento ambulatorial (medicamentoso) para a osteoporose, o SUS provê assistência hospitalar aos pacientes com fraturas

osteoporóticas. Entre 2000 e 2006, 72.265 mulheres, na pós-menopausa, receberam medicamentos para tratamento de osteoporose através do programa de medicamentos excepcionais do Ministério da Saúde. O gasto médio mensal foi de R\$ 68,76, com valor mediano de R\$ 49,68. O gasto médio mensal foi progressivamente maior com o envelhecimento dessas mulheres, passando de R\$ 64,33 nas mulheres de 50 a 59 anos para R\$ 170,63 no grupo de 80 anos e mais (BRANDAO e colab., 2013).

Pesquisas frequentes a respeito da osteoporose, evidenciaram que ela é uma doença multifatorial de ambos os sexos, a ocorrência devido a um declínio na função ovariana ou testicular é apenas uma das várias outras patologias progressivas e cumulativas (ALMEIDA e colab., 2017a; MANOLAGAS e colab., 2013). Medidas preventivas podem ser tomadas para retardar a progressão e a inevitabilidade da osteoporose, como uma dieta bem elaborada com nutrição adequada construirá uma base forte para evitar a perda óssea. Exercícios e movimentos com peso ao longo dos anos, bem como prevenção contra quedas, descanso adequado e estilo de vida moderado ajudam a reduzir ao mínimo a perda óssea. Após um diagnóstico de osteoporose, os pacientes que têm acesso a medicações e tratamentos de uma perspectiva ocidental e oriental podem desacelerar ainda mais a instauração do desequilíbrio entre a taxa de reabsorção e formação óssea (OLSON, 2014).

1.2.2 Fisiopatologia da perda óssea

A perda óssea resulta de um desequilíbrio na formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção óssea pelos osteoclastos. A maioria dos tratamentos para osteoporose visa ajustar este desequilíbrio (MCLENDON e WOODIS, 2014).

O remodelamento ósseo é o processo pelo qual o osso antigo é substituído por osso novo. O processo normal de remodelação óssea consiste nas seguintes fases, que ocorrem de forma simultânea: ativação da fase de repouso, reabsorção, reversão e formação. Na fase de ativação do remodelamento, os osteoclastos são recrutados para a superfície do osso. Na fase de reabsorção, os osteoclastos geram um microambiente ácido entre a célula e a superfície do osso para dissolver ou reabsorver o conteúdo mineral ósseo. Na fase reversa, os osteoclastos sofrem apoptose e os osteoblastos são recrutados para a superfície óssea. Na fase de formação, os osteoblastos depositam colágeno que é mineralizado para formar novo osso. Na menopausa, a deficiência de

estrogênio prejudica o ciclo normal e leva a um aumento da atividade de reabsorção osteoclástica sem um aumento da atividade osteoblástica, com isso a quantidade do osso reabsorvido é maior que a quantia depositada, o que leva a uma perda de osso. Este processo foi originalmente descrito como "desacoplamento" (GALLAGHER e colab., 2014).

Osteoclastos, os quais compartilham precursores com macrófagos, são derivados de células-tronco hematopoiéticas e são únicos em sua função de reabsorção de matriz óssea. Já os osteoblastos e suas células progenitoras constituintes se originam de células-tronco mesenquimais. A regulação coordenada de osteoblastos e osteoclastos é fundamental para a manutenção da remodelação óssea fisiológica e é rigorosamente controlada pela modulação de sinais moleculares (XIE, Yong e colab., 2017).

Tanto em humanos quanto em roedores, os estrogênios ou andrógenos suprimem a reabsorção óssea em superfícies ósseas trabeculares e endocorticais, diminuindo o número de osteoclastos. Isto resulta da atenuação da diferenciação de osteoclastos bem como encurta sua vida útil, estimulando a apoptose ações anti-osteoclastogênicas dos esteroides sexuais são mediadas via efeitos diretos em células da linhagem de osteoclastos, bem como indiretamente (ALMEIDA e colab., 2017b).

As mudanças celulares que ocorrem na deficiência de estrógeno, são principalmente devido a um aumento na produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e as células da linhagem estromal / osteoblástica se tornam mais sensíveis a IL-1. IL-1 e TNF estimulam as células estromais / pré-osteoblastos a liberarem diversas citocinas (IL-6, fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), IL-11, fator estimulante de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator transformador do crescimento (TGF)) (KLEIN-NULEND e colab., 2015).

A citocina final na cascata de osteoclastogênese é o ligante RANK (receptor ativador do ligante do fator B nuclear) que é produzido a partir de osteoblastos e se liga ao seu receptor RANK em osteoclastos. O RANKL possui um antagonista natural, a osteoprotegerina (OPG), que é um receptor solúvel secretado pelas células da linhagem osteoblástica estromal. A OPG é estimulada pelo estrogênio. A partir do exposto, pode-se entender que o fator de desacoplamento secretado pelos osteoblastos é o RANKL. Esses fatores aumentam a reabsorção óssea aumentando o tamanho do pool de pré-osteoclastos na medula óssea e são regulados pelo estrogênio. A ação importante do estrogênio é aumentar a secreção de OPG e diminuir M-CSF e RANK, o que acarreta na

redução da atividade de reabsorção óssea proveniente dos osteoclastos (GALLAGHER e colab., 2014).

Essa perda do equilíbrio dinâmico entre formação e reabsorção óssea, mediada pelo estrogênio, se inicia já no período da pré-menopausa. No momento da menopausa há uma rápida aceleração na perda óssea que começa no ano anterior à menopausa e continua por mais 3 anos antes de desacelerar, embora a taxa de perda óssea nos anos 4-8 anos após a menopausa seja ainda alto (TELLA e GALLAGHER, 2014).

A densitometria por absorção de raios X de dupla energia (DXA) detecta declínio inequívoco na densidade mineral óssea durante a perimenopausa tardia, quando as mulheres experimentaram entre 3 e 11 meses de amenorréia, enquanto pouca ou nenhuma perda é observada durante a perimenopausa precoce, quando os ciclos menstruais são irregulares. As categorias menstrualmente definidas de transição da menopausa, que classificam as fases da menopausa de acordo com a irregularidade menstrual ou o número de meses de amenorréia, são preditores imprecisos de quando o período menstrual final (PMF) ocorrerá. As mulheres que estão na perimenopausa precoce ou tardia podem estar mais ou menos proximais ao seu PMF, e as taxas de perda da densidade mineral óssea (DMO) podem, portanto, diferir dentro dos estágios menstrualmente definidos. Similarmente, o tempo em que a perda óssea desacelera após o PMF não pode ser discriminado usando os estágios de transição da menopausa menstrualmente classificados. Este é um período de perda rápida de DMO que acompanha o período menstrual final e começa cerca de um ano antes, e recentemente relata que a perda de DMO na menopausa é influenciada independentemente por etnia e massa corporal (GREENDALE e colab., 2012).

Durante a primeira fase da perda óssea da menopausa, as mulheres apresentam um balanço de cálcio acentuadamente negativo. Há uma diminuição relacionada à idade na absorção de cálcio que contribui para um balanço negativo adicional do cálcio. A má absorção de cálcio causa hiperparatireoidismo secundário que aumenta a reabsorção óssea, causando mais perda óssea. Em pessoas com idade superior a 80 anos, a resposta de absorção de cálcio relativa à 1,25- di-hidroxitamina D sérica é menor do que em jovens, sugerindo que parte do problema do envelhecimento é a resistência intestinal à 1,25-dihidroxitamina D endógena circulante. Há um declínio na formação da produção de 1,25-di-hidroxitamina D no rim envelhecido. Dessa forma, parece haver duas etapas separadas envolvidas na má absorção de cálcio, um defeito primário ainda

não especificado envolvendo o intestino e o outro devido à diminuição da produção de 1,25-di-hidroxivitamina D pelo envelhecimento do rim. A deficiência de vitamina D agrava a situação, causando hiperparatireoidismo secundário e aumentando a reabsorção óssea (DRAKE e colab., 2015; MCLENDON e WOODIS, 2014).

1.2.3 Diagnóstico da osteoporose:

Os objetivos das medições da densidade mineral óssea são fornecer critérios diagnósticos, informações sobre a probabilidade de fraturas e um valor de referência para monitorar o paciente tratado ou não tratado. A densidade mineral óssea (DMO) é a quantidade de massa óssea por unidade de volume (densidade volumétrica) ou por unidade de área (densidade de área).

A força óssea reflete principalmente a integração entre a densidade óssea e a qualidade óssea. A densidade óssea é expressa em gramas de mineral por área ou volume. A qualidade óssea refere-se à arquitetura óssea (por exemplo, microfraturas) e mineralização. A osteoporose pode ainda ser caracterizada como primária ou secundária. A osteoporose primária pode ocorrer em ambos os sexos em todas as idades, mas geralmente acompanha a menopausa em mulheres e ocorre mais tarde em homens. Em contraste, a osteoporose secundária é um resultado de medicamentos (por exemplo, glicocorticoides), outras condições (por exemplo, hipogonadismo) ou doenças (por exemplo, doença celíaca) (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001).

A densidade óssea foi medida de muitas maneiras no passado, densitometria do rádio, calcâneo, ultrassom do calcânhar, rádio e falanges, radiografia do metacarpo e falanges, tomografia computadorizada da coluna vertebral e agora a densitometria por absorção de raios X de dupla energia (DXA) tornou-se o exame padrão (TELLA e GALLAGHER, 2014).

A osteoporose é diagnosticada clinicamente quando há uma presença de fratura por fragilidade ou densidade mineral óssea medida por densitometria óssea que é menor ou igual a 2,5 desvios-padrão abaixo de uma população de referência para adultos jovens. Por convenção, o valor é descrito como um escore T. Escore Z refere-se a um valor de DMO que é -2,5 abaixo da média para a própria população analisada (LORENTZON, 2019).

1.2.4 Fatores de risco para Osteoporose:

Em 2003, a OMS iniciou um projeto para integrar informações sobre fatores de risco e densidade mineral óssea (BMD) para melhor prever o risco de fraturas em homens e mulheres em todo o mundo. O resultado foi o lançamento em fevereiro de 2008 de um Relatório Técnico da OMS e um algoritmo para avaliar o risco de 10 anos de uma grande fratura relacionada à osteoporose, incluindo fraturas de quadril, coluna, antebraço e úmero. Os fatores de risco clínicos no algoritmo (idade, índice de massa corpórea, fratura por fragilidade prévia, uso de glicocorticoides orais, história de fratura dos pais, tabagismo atual, ingestão excessiva de álcool, osteoporose secundária e artrite reumatoide) foram validados em 60.000 homens e mulheres de 12 coortes prospectivas de base populacional e confirmadas em outros estudos, incluindo o Estudo de Fraturas Osteoporóticas e a Iniciativa de Saúde da Mulher (DAWSON-HUGHES, 2008).

1.2.5 Manejo da osteoporose

1.2.5.1 Manejo não farmacológico:

Várias intervenções, incluindo uma ingestão adequada de cálcio e vitamina D, são aspectos fundamentais para qualquer programa de prevenção ou tratamento da osteoporose, incluindo exercícios regulares de sustentação de peso e fortalecimento muscular, redução do consumo excessivo de álcool e tratamento de fatores de risco para queda (SÖZEN e colab., 2017).

Para manter o cálcio sérico em um nível constante, é necessário um suprimento externo de cálcio adequado; caso contrário, baixos níveis séricos de cálcio promovem a reabsorção óssea para trazer os níveis de cálcio ao normal. Os requerimentos de cálcio aumentam entre os idosos. Assim, a população idosa é particularmente suscetível à deficiência de cálcio (ROSS, A Catharine e colab., 2011).

A vitamina D é um pró-hormônio sintetizado na pele pela exposição aos raios ultravioleta B (UVB) da luz solar ou ingerida. Essa sofre transformações químicas até se transformar em sua forma ativa, com importantes funções na fisiologia osteomíneral,

especialmente no que se refere à absorção intestinal e à homeostase do cálcio (RIZZOLI, 2018).

A inadequação dos níveis de vitamina D é tida como uma das potenciais causas para falha do tratamento medicamentoso da osteoporose (perda significativa de DMO e fraturas). Este cofator está envolvido na absorção de cálcio e fósforo, no intestino, auxiliando na mineralização e manutenção da qualidade óssea, além de exercer importante ação na musculatura periférica e no equilíbrio, podendo interferir no risco de quedas. Dessa forma, a suplementação dessa vitamina tem benefícios diretos sobre a saúde óssea (GAKSCH e colab., 2017).

Indivíduos em idade senil sintetizam quantidades mais baixas de vitamina D na pele, bem como, tendem a menor exposição solar que adultos mais jovens. Além disso, frequentemente, esses fatores estão associados a dietas nutricionalmente pobres. Levando, dessa forma, a um quadro de hipovitaminose D. Aumentar os níveis dessa vitamina diminuiu a incidência de quedas em pessoas idosas em 19%. É importante ressaltar que, níveis normais dessa vitamina é um pré-requisito para a eficácia da medicação anti-osteoporose (GAKSCH e colab., 2017).

Por outro lado, o exercício físico tem o potencial para ser uma maneira segura e eficaz para evitar a perda óssea em mulheres pós-menopáusicas. Intervenções de exercício são tipicamente aquelas que sobrecarregam ou carregam mecanicamente os ossos (quando os ossos suportam o peso do corpo ou quando o movimento é resistido, por exemplo, ao usar pesos) e incluem aeróbica, treinamento de força, caminhada e tai chi. A carga mecânica por meio do exercício tem o potencial de ser uma maneira segura e eficaz de evitar ou retardar o aparecimento de osteoporose em mulheres na pós-menopausa. Além disso, os exercícios de força e equilíbrio contribuem para a redução do risco de fratura por meio de sua eficácia na redução do risco de quedas (HOWE e colab., 2011).

As quedas são a principal causa de morbidade e mortalidade relacionadas a lesões entre idosos nos Estados Unidos, e causa precipitante da maioria das fraturas osteoporóticas. As quedas levaram a um número estimado de 33 mil mortes em 2015 nos Estados Unidos. Dessa forma, algumas medidas devem ser tomadas para evitar quedas no domicílio, particularmente para pacientes frágeis ou tomando alguns medicamentos que afetam o estado de alerta mental (GROSSMAN e colab., 2018).

Já o uso crônico do álcool pode levar ao decréscimo da DMO, bem como o aumento do risco de fraturas com efeitos diretos na formação óssea e redução da atividade osteoblástica (DANFORD e colab., 2019).

1.2.5.2 Manejo Farmacológico:

Intervenções farmacológicas podem ser classificadas em agentes anti-reabsortivos que previnem a reabsorção óssea e agentes anabólicos que auxiliam na nova formação óssea. Agentes anti-reabsortivos aprovados nos EUA incluem terapia de reposição hormonal (TRH), bisfosfonatos, SERMS, Denosumab. Agentes anabólicos incluem ranelato de estrôncio (GALLAGHER e colab., 2014).

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido recomendada para a pós-menopausa mulheres para ajudar a reduzir fraturas vertebrais, do quadril e outras, bem como o câncer do cólon. A TRH, porém, é recomendada com cautela, devido ao aumento do risco de câncer de mama, doença coronariana, acidente vascular cerebral e tromboembolismo. No entanto, é usado para aqueles que não toleram outros tratamentos para osteoporose (LORENTZON, 2019).

Bisfosfonatos orais como alendronato e risedronato, além do Actonal, Boniva e Fosamax provaram aumentar a DMO e diminuir fraturas vertebrais, de quadril e outras. O idandronato demonstrou aumentar a DMO e diminuir as fraturas vertebrais e pode ser tomado por via oral ou intravenosa. O zoledronato é um bisfosfonato intravenoso que demonstrou uma diminuição das fraturas vertebrais em 70% e fraturas de quadril em 41%. Também tem o efeito de diminuir a taxa de mortalidade em pacientes com fraturas recentes do quadril. O zoledronato também é muito eficaz em pacientes com mais de 75 anos (MCLENDON e WOODIS, 2014).

Os efeitos colaterais dos bisfosfonatos intravenosos podem causar sintomas agudos semelhantes à gripe por alguns dias após a injeção. Uma vez que também pode causar hipocalcemia, recomenda-se cálcio e vitamina D. Também pode haver um aumento na fibrilação atrial grave, mas mais estudos são necessários para comprovar essa observação. Os pacientes demonstraram ter osteonecrose da mandíbula quando em altas doses de bifosfonato intravenoso, mas não com doses baixas(TU e colab., 2018).

O raloxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio ou SERMS. Tem efeitos na construção óssea, mas também mostrou ter efeito sobre a mama e

endométrio. Mostrou aumentar a DMO nas vértebras lombares e osso femoral em 2% a 3%, e demonstrou ter fraturas vertebrais reduzidas em 30% - 50%. Ele tem o benefício adicional de uma redução no câncer de mama. No entanto, também pode aumentar as ondas de calor e aumentar o risco de tromboembolia venosa (LAGARI e colab., 2018).

O denosumabe é um anticorpo monoclonal direcionado contra o ativador do receptor do fator nuclear kappaB ligante (RANKL). O RANKL sinaliza reguladores para a formação de osteoclastos, e o denosumabe inibe a ação do RANKL na reabsorção osteoclástica e óssea. O denosumab demonstrou aumentar a DMO e é administrado em injeções semestrais. (RIZZOLI, 2018)

O ranelato de estrôncio aumenta os osteoblastos e diminui os osteoclastos, com estudos mostrando um aumento de 12,7% na DMO vertebral com uma redução de 41% nas novas fraturas. Este medicamento tem bons efeitos em pessoas com mais de 80 anos. Os efeitos colaterais incluem diarreia e aumento do risco de tromboembolismo venoso; raramente uma reação de hipersensibilidade pode causar erupção cutânea, eosinofilia e sintomas sistêmicos (OLSON, 2014)

Tanto os medicamentos orientais e ocidentais concordam com exercícios e dieta, além de suplementos para prevenção e tratamento da perda de densidade óssea. Se essas medidas não forem suficientes, tanto os remédios ocidentais quanto os orientais têm opções adicionais de tratamento a oferecer. Alguns dos tratamentos ocidentais incluem medicamentos como raloxifeno, bifosfonatos, ranelato de estrôncio, suplementos, Terapia de Reposição Hormonal (TRH) e denosumabe. A maioria desses medicamentos tem sérios efeitos negativos a longo prazo no fígado, rins e ossos, com outros efeitos colaterais da trombose venosa, osteonecrose da mandíbula, hipocalcemia, aumento de ondas de calor, dores de cabeça, câncer de mama, derrame e doenças cardíacas (OLSON, 2014).

1.3 Acupuntura

A acupuntura, técnica mais conhecida da medicina tradicional chinesa (MTC), se baseia na inserção de agulhas em pontos pré-determinados no corpo. Esses pontos estão localizados sobre supostos canais de energia chamados de meridianos por onde circula o que a MTC chama de *Qi*. A acupuntura possui uma base teórica tradicional que norteia a sua terapêutica desde milhares de anos até os dias atuais. Essa base é

composta, dentre outras, pelas teorias dos meridianos e da movimentação do *Qi*, teorias essas que compõem o arcabouço de conhecimento tradicional da MTC (CHEUNG e colab., 2001).

Os mecanismos tradicionais de acupuntura baseados em conceitos como meridiano, *Qi* e *yin-yang* permaneceram inalterados por milhares de anos. Atualmente é possível encontrar interpretações modernas desses conceitos. O que se segue é um possível conjunto de interpretação baseado em modelos neurobiológicos e de rede de fásia.

Os meridianos são os principais canais da rede de fásia do tecido conjuntivo no corpo. Estimulação de acupuntura em locais ao longo desta rede tende a produzir uma resposta mais forte do que em outros sítios por causa da concentração de tecidos conjuntivos e terminações nervosas (LANGEVIN e YANDOW, 2002).

Os pontos de acupuntura tradicionais são os locais onde a estimulação por acupuntura produz uma resposta mais forte do que os locais vizinhos, devido à maior concentração de tecidos conjuntivos e terminações nervosas. Esses pontos foram descobertos por meio da observação minuciosa de pesquisadores e médicos antigos. No entanto, a diferença entre um ponto de acupuntura tradicional e um ponto de não-acupuntura reside na intensidade da resposta, em vez de componentes estruturais (QUIROZ-GONZÁLEZ e colab., 2017).

Qi refere-se aos sinais dentro dos canais que medeiam os efeitos da acupuntura. Embora o sinal nervoso seja o mais bem compreendido, outros sinais possíveis que se aproximam do conceito de *yin-yang* são a propagação da força mecânica e o movimento das moléculas sinalizadoras parácrinas e a manutenção da homeostase através dos ramos parassimpático e simpático do sistema nervoso autônomo (CHENG, 2014).

A acupuntura é considerada por muitos como a principal entre as várias modalidades de medicina complementar e alternativa em termos de aceitabilidade e nível de evidência de sua eficácia. Além disso, a acupuntura tem uma sólida base científica construída sobre os abundantes estudos realizados nas últimas décadas.

A medicina tradicional chinesa vem sendo usada com frequência no Oriente há mais de 4000 anos e possui uma base teórica específica que norteia a sua terapêutica desde seu início até os dias atuais. A sua base de compreensão está na relação do homem com os elementos e fenômenos da natureza. Porém, essa relação é interpretada

de uma forma diferente da forma ocidental ao colocar o homem como parte integrante e não modificadora dos elementos naturais (MACIOCIA e MING, 1996).

Para a MTC, o "universo" do ser humano, tanto fisiologicamente quanto psicologicamente, reproduz o que acontece nas relações naturais e está intrinsecamente ligado a elas. Isso faz com que a compreensão do funcionamento psicofisiológico humano seja de uma forma mais generalista e não-compartmentalizada em sistemas separados e individualizados (MACIOCIA e MING, 1996).

A forma de validação oriental da prática da MTC foi, por muitos anos, considerada diametralmente diferente da que é feita no ocidente. Ela se fundamenta em observações feitas ao longo dos anos pelos profissionais e na experiência clínica milenar. Nesse sentido, para a medicina chinesa, quanto maior a antiguidade de um texto, maior confiabilidade e por conseguinte, maior validade ele possui. O mais antigo texto escrito que se tem notícia sobre o tema se chama *Huang Di Nei Jing* (Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo) e provavelmente data de 2383 a.C. no qual já havia descrições sobre os efeitos da acupuntura. Esse texto, mais tarde, foi editado, comentado e separado em duas partes que são, até hoje, fontes primordiais para o entendimento tradicional da medicina oriental: o *Su Wen* e o *Ling Shu* (MACIOCIA e MING, 1996).

O *Qi* é uma palavra chinesa que não possui uma tradução literal. O seu significado mais próximo, mas ainda incompleto, seria “energia” ou “energia universal”. De acordo com a teoria chinesa, o *Qi* é o que flui dentro dos meridianos, além de circular junto com o sangue nos vasos sanguíneos. É o que sustenta toda forma de vida e promove energia para a manutenção dos processos fisiológicos. Se o *Qi* se move com suavidade, o sangue irá se mover, então se tem saúde. Se o *Qi* se torna deficiente, ou é impedido de se movimentar ou ainda apresenta sinais de “estagnação”, a patologia se apresenta. (MACIOCIA e MING, 1996).

A introdução das agulhas nos pontos de acupuntura, de acordo com a teoria tradicional da medicina chinesa, visa à manutenção do fluxo suave e harmonioso do *Qi*, tonificando-o quando este estiver deficiente, sedando-o quando estiver em excesso ou dispersando-o quando estiver estagnado, e desta forma procurando manter a saúde do organismo (ROSS, Jeremy, 2002).

Segundo a MTC, os meridianos são canais de energia que percorrem todo o corpo, conduzem e distribuem o Qi para todas as regiões. Eles são separados em três tipos (ROSS, Jeremy, 2002):

Os chamados principais que são em número de 12, são bilaterais e possuem relação fisiológica direta com o sistema energético que lhe dá o nome;

Os chamados “Vasos Maravilhosos” que são em número de 8 e não possuem relação direta com os sistemas energéticos;

Os chamados vasos colaterais que são em grande número e estão relacionados com a pele e os músculos.

Até o momento, ainda persistem várias dúvidas sobre as relações anátomo fisiológicas conhecidas para os meridianos no corpo humano, pois, ainda não foi localizado nenhum sinal que poderia indicar a existência desses “canais de energia”. Nesse sentido, alguns autores têm realizado trabalhos com o intuito de tentar encontrar a comprovação, à luz da ciência, da existência anátomo-fisiológica dos meridianos.

1.3.1 Acupuntura e osteoporose

Na MTC, a osteoporose é considerada um desequilíbrio de *Yin*, *Yang*, *Qi* e Sangue. A separação entre Yin e Yang resulta no esgotamento da vitalidade. Isso significa que à medida que as pessoas envelhecem, esse equilíbrio é interrompido e esgota-se a vitalidade por meio das escolhas de estilo de vida, estresse, excesso de trabalho e dieta inadequada. Criar esse desequilíbrio de *yin* e *yang* leva diretamente ao esgotamento dos órgãos *zang-fu* e das estruturas do corpo, incluindo dos ossos (XU e colab., 2005).

Ao analisar os diferentes sistemas de órgãos segundo a MTC, um desequilíbrio pode ser criado por uma deficiência na energia do baço. O baço é responsável pelo Qi pós-celestial e pela transformação e transporte de *Gu Qi*, os nutrientes do corpo, é responsável pela digestão e separação dos nutrientes. Olhando para ele do ponto de vista ocidental, se não está ocorrendo a digestão e absorção dos nutrientes, como vitamina K, cálcio e magnésio, será desencadeada uma reação em cadeia da deficiência de nutrientes de construção óssea, levando à osteoporose. Na MTC, os rins controlam os ossos, armazenam a essência, são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento, regulam a circulação da água, suprem a medula e determinam a condição dos ossos. Pode-se então

prever que, se uma pessoa possui deficiência nos rins, é mais provável que a pessoa tenha osteoporose. Para as mulheres e para os homens, em menor grau, a depleção de *Yin* nos rins é a principal causa da osteoporose. Uma deficiência de *Yin* leva a um excesso de *Yang*, levando a um excesso de fogo, que seca a água, fazendo com que os ossos encolham e encurtem (XU e colab., 2005).

À medida em que se envelhece, naturalmente a vitalidade e o *Qi* pré e pós-celestial é perdido. O *Qi* pré-celestial é obtido dos pais na concepção, e determina a constituição do indivíduo. O *Qi* pré-celestial é então apoiado e nutrido ao longo dos anos pelo *Qi* pós-celestial, que é composto da comida ingerida e processada pelo sistema do órgão do baço. Se os níveis de *Qi* anteriores e posteriores forem fortes, os indivíduos terão um forte crescimento e desenvolvimento, e será capaz de evitar doenças e evitar o envelhecimento rápido. Ambas as essências pré e pós-celestial podem ser consumidas por uma vida de excesso de trabalho, sexo excessivo, pobre e / ou excesso de consumo de alimentos. A recomendação é que levar uma vida moderada ajudará a pessoa a viver mais saudável e por mais tempo. Olhando para este modelo em relação aos ossos, é evidente que aqueles que nasceram com fraco *Qi* pré-celestial terá ossos frágeis e fracos e crescimento retardado. Por outro lado, aqueles que nascem com forte *Qi* pré-celestial, mas que leva uma vida de excesso de indulgência e excesso de trabalho ou má alimentação, experimentará um envelhecimento precoce e ossos frágeis. A MTC acredita em preservar sua essência para viver uma vida longa e saudável (XU e colab., 2005).

2.0 CAPÍTULO II: DESCRIÇÃO DE UM MODELO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ANESTESIA PARENTERAL E ANALGESIA PARA PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS INVASIVOS EM RATOS.

2.1 Introdução

A utilização de ratos para procedimentos cirúrgicos experimentais é amplamente difundida na comunidade científica por diversos motivos, envolvendo desde os custos de manutenção e criação dos animais, alta resistência a infecções, particularidades de seu ciclo de vida, grande capacidade reprodutiva, fácil manipulação, além de serem

utilizados em vários modelos biológicos relevantes, como modelos apropriados de envelhecimento, aprendizado e osteoporose por exemplo (CARTER e colab., 2020).

Com o objetivo de alcançar o mais alto padrão de consideração ética na regulamentação da utilização dos animais nos experimentos científicos, utiliza-se o princípio dos 3Rs (replacement, reduction, and refinement) ou a substituição, redução e refinamento da pesquisa animal (KIRK, 2018). Logo a redução do número de animais utilizados em cada experimento, o refinamento das técnicas objetivando evitar a dor e o sofrimento desnecessários, e a substituição por métodos alternativos são imprescindíveis.

No Brasil, compete ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica. Esse conselho foi criado pela Lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008, também conhecida como Lei Arouca, que normatiza os procedimentos para uso científico de animais (“Base Legislação da Presidência da República - Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008”, [S.d.]).

Assim exposto, fica evidente que o controle da dor, analgesia e anestesia desses animais são preocupações constantes tanto dos pesquisadores envolvidos com a experimentação animal, quanto do poder público brasileiro.

A anestesia é um estado de total ausência de dor e outras sensações durante uma cirurgia. A anestesia pode ser dividida em anestesia local, anestesia regional e anestesia geral. A anestesia geral pode ser definida como todo ato anestésico que pode ser reversível e que leve ao relaxamento muscular com ausência de reação de defesa contra agressão; supressão temporária da percepção de dor; proteção neurovegetativa e perda de consciência (AKIMOVNA e RIVERA, [S.d.]).

A anestesia em animais de laboratório requer uma avaliação bastante criteriosa uma vez que a dor e o estresse nesses animais não é facilmente avaliada. Atualmente já se tem um grande volume de informações a respeito das características neuroanatômicas e neurofisiológicas dos animais, assim como uma boa compreensão da fisiologia da dor nesses animais (GOLDBERG, 2010).

O ato anestésico é basicamente dividido em três períodos, a o período pré, trans e pós-anestésico. Durante período pré-anestésico é realizada uma avaliação geral dos animais, sua pesagem, contenção e preparação para o ato anestésico. Nesse período

ocorre a administração da medicação pré-anestésica (MPA), procedimento que antecede a anestesia geral e proporciona ao animal uma indução anestésica mais tranquila e agradável, além de potencializar os anestésicos gerais. A MPA apresenta como vantagem a redução da dor e do desconforto, e redução de efeitos adversos causados pela anestesia geral (SCHANAIDER e SILVA, 2004).

O período trans-anestésico é composto pelo intervalo de tempo que compreende o da anestesia até o início da recuperação. É um período crítico e de grande importância e requer uma grande atenção principalmente em relação aos reflexos pertinentes ao plano anestésico adequado. O período pós-anestésico compreende o início da recuperação até o restabelecimento total da consciência do animal, esse período é dividido em imediato e tardio. As vias mais comumente usadas em anestésias são a oral, a inalatória, a intramuscular, a intravenosa ou endoflébica, a subcutânea, a tópica e a espinhal (GORSKY, 2019; TURNER, Patricia V. e colab., 2011).

2.2 Objetivos

Descrever um protocolo experimental de analgesia e anestesia parenteral para procedimentos cirúrgicos invasivos em ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar).

2.3 Justificativa

Rotineiramente os ratos são utilizados na experimentação científica e em muitos casos se faz necessária a realização de procedimentos cirúrgicos invasivos que requer que os animais sejam anestesiados. Dessa forma a descrição de uma técnica anestésica por via parenteral e que demonstre os passos de um procedimento anestésico, incluindo imagens e vídeos se faz necessária para uma maior compreensão da técnica por pesquisadores que ainda não estão habituados com esse tipo de experimentação em sua rotina laboratorial.

A anestesia por via parenteral não requer a utilização de equipamentos específicos, como ocorre na anestesia inalatória, logo, assim como na anestesia inalatória é uma maneira segura e ética de realizar o procedimento anestésico, também traz segurança aos pesquisadores e aos animais e é mais acessível a um maior número de pesquisadores.

Além disso, esse protocolo está de acordo com o que é requisitado pelo CONCEA, para procedimentos com grau de invasividade 3. Esse grau de invasividade é compatível com experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral) (“RESOLUÇÃO Nº 47, DE 1º DE OUTUBRO DE 2020 - RESOLUÇÃO Nº 47, DE 1º DE OUTUBRO DE 2020 - DOU - Imprensa Nacional”, [S.d.]; “RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 39, DE 20 DE JUNHO DE 2018 - Imprensa Nacional”, [S.d.]).

Dessa forma, a descrição de um protocolo de anestesia e analgesia se justifica pois poderá auxiliar outros pesquisadores em seus experimentos que necessitam da realização de procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados a realizarem seus experimentos respeitando o Princípio dos 3R’s (RUSSELL e BURCH, 1959). Tal trabalho é importante, pois promove a redução do uso de animais ao compartilhar os mesmos animais em diferentes estudos científicos e contribui também para o refinamento dos protocolos experimentais, afim de reduzir o estresse, a dor e aprimorar a utilização adequada de anestésicos e analgésicos, em dosagens mais seguras e evita mortes desnecessárias dos animais.

2.4 Métodos

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) no protocolo CEUA nº 6126230419 (ID000208), ANEXO A.

O procedimento foi realizado em 39 ratas da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com média de 20,3 semanas de vida e desvio padrão de 1,537 semanas. O número amostral e a média de idade estão relacionados a outro experimento que foi conduzido em conjunto, utilizando os mesmo animais e descrito no capítulo 4. Os animais tinham como peso médio 254,8 gramas e desvio padrão de 14,04 gramas. As

ratas foram mantidas em caixas de polipropileno com medidas de 49x34x21 centímetros de comprimento, largura e altura na densidade de 4 a 5 animais por caixa e foram mantidas em um ciclo de claro e escuro de 12 horas em ambiente com temperatura aproximada em 20°C e umidade natural.

A lista dos materiais necessários para a realização do procedimento consta nas Tabelas 1, 2 e 3 a ficha de procedimento individualizada na Tabela 4.

2.4.1 Avaliação clínica do animal

Inicialmente os animais passaram por uma avaliação clínica de um Médico Veterinário, envolvendo inspeção e palpação. Essa avaliação teve como objetivo observar o grau de hidratação das mucosas do animal, cuidado com a pelagem, apetite (consumo de água e alimento), foi verificado se o animal tinha algum comportamento de dor como expressão facial, vocalização, aparência, resposta ao manejo e agressividade. Os animais apresentavam mucosas e pele normocoradas, acianóticos, anictéricos, perfusão capilar inferior a dois segundos, bons cuidados com a pelagem, boa higiene do orifício anal, padrão respiratório usual, ausência de secreções respiratórias ou oculares, ausência de edema, fezes e urina de aspecto e volume usual e comportamento adequado para a espécie. A palpação visava principalmente verificar se os animais apresentavam alguma região edemaciada, com maior sensibilidade ao toque e com diferenças de temperatura acentuadas, e também foi verificada a resposta a palpação abdominal a fim de encontrar alguma anormalidade (RUSSELL e BURCH, 1959).

Os animais não foram submetidos a jejum prévio, uma vez que animais dessa espécie não vomitam e além disso, outro fator relevante é que os roedores têm uma queda na glicemia sanguínea com facilidade caso sejam submetidos a jejum prolongado (AKIMOVNA e RIVERA, [S.d.]).

Após a avaliação e a percepção que os animais se encontravam em bom estado geral e devidamente hidratados, os animais foram pesados em uma balança de precisão (Tabela 1) e o peso foi registrado em planilha individualizada (Tabela 4). A temperatura foi aferida por meio de um termômetro infravermelho (Tabela 1) e a temperatura também foi anotada na ficha do animal, após isso teve-se início a aplicação da medicação pré-anestésica (MPA).

2.4.2 Medicação pré-anestésica

Inicialmente os animais receberam uma aplicação via subcutânea (SC) de morfina na dose de 2,5 mg/Kg (Tabela 3) (RICHARDSON, Claire A. e FLECKNELL, 2005). A morfina é um analgésico usado para tratar a dor aguda e crônica e é comumente o agente ao qual todos os outros analgésicos são comparados. Os opióides ligam-se aos receptores, tanto no sistema nervoso central como em outros tecidos. A ligação de um opióide endógeno ou exógeno com o receptor promove a inibição do segundo mensageiro, altera o transporte do cálcio na membrana celular e atua pré-sinápticamente impedindo a liberação de neurotransmissor. A morfina apresenta meia-vida de eliminação de cerca de 2 horas (CHRISTRUP, 1997).

Após 20 minutos foi feita uma aplicação do tranquilizante fenotiazínico Acepromazina por via intramuscular (IM) na dose 0,5mg/Kg. A Acepromazina é um potente agente depressor do SNC, é um medicamento antipsicótico, mas seu uso atual é principalmente em animais como sedativo e antiemético (ECKLEY e colab., 2020).

Todas essas medicações foram injetadas com a utilização de seringas descartáveis de 1 mL e com a agulha (26Gx1/2). As descrições dos produtos, apresentações e fabricantes constam na Tabela 2 e 3 e as doses dos medicamentos, bem como a concentração e volume aplicado por grama de animal, constam na Tabela 4.

2.4.3 Anestesia

Como anestésico foi realizado uma combinação de cetamina e xilazina na mesma seringa e aplicadas por via intraperitoneal (IP). Para evitar a sensação desagradável da aplicação dos fármacos pela via IP, 10 minutos antes da aplicação dos anestésicos foi realizada uma aplicação de Cloridrato de Lidocaína sem vasoconstritor pela via IP. Cada 0,25mL de Cloridrato de Lidocaína foi diluída em 0,75 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% antes da aplicação intraperitoneal, afim de diluir a substância para 0,5% (“Guia anestesia e analgesia em animais de laboratório”, [S.d.]).

A via de administração intraperitoneal é a mais comumente utilizada, devido à fácil execução, à possibilidade de se infundir grandes volumes e ao caráter irritativo de algumas substâncias quando administradas pelas vias intramuscular e subcutânea. O local correto para se realizar a injeção é no quadrante abdominal inferior direito do

animal e as agulhas recomendadas para os ratos são as de calibre 22-26G (GREENFIELD, 2019; RODRIGUES e colab., 2017).

A anestesia com cetamina-xilazina é conhecida por suas propriedades de ação rápida e prolongada e fornece analgesia, imobilidade e perda de consciência suficientes e leva a uma anestesia dissociativa, pois é capaz de dissociar o córtex cerebral, causando analgesia sem perda dos reflexos protetores, por esses motivos é frequentemente usada para anestesia em ratos (RITSCHL e colab., 2015).

Após a administração dos anestésicos deve-se observar o plano ou estágio anestésico dos animais, de acordo com o esquema clássico de Guedel, na anestesia pelo éter, adaptado posteriormente a todos os outros anestésicos. Guedel foi um médico estadunidense que teve uma relevante atuação durante a I Guerra Mundial e estabeleceu quatro estágios definidos em algarismos romanos, sendo que o estágio III é dividido em quatro planos representados em números arábicos. Esses estágios foram baseados nas características cardiorrespiratórias, reflexos protetores, posicionamento de globo ocular, tamanho de pupilas, salivação e miorelaxamento (DOUGLAS, 1958; KEYS, 1975; SIDDIQUI e KIM, 2020).

O estágio I vai desde o início da administração do fármaco anestésico até a perda da consciência. O estágio II é conhecido como de excitação ou delírio, é responsável por perda da consciência e liberação de centros altos do sistema nervoso central, daí ocorrer a incoordenação dos movimentos harmônicos, este estágio se caracteriza por incoordenação motora; hiperalgesia; defecação por hiper-reflexia (diferente da causada pelo estresse); dilatação pupilar e lacrimejamento; taquipnéia com hiperventilação e respiração arritmica. Essa fase se torna mais curta com a aplicação a MPA (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020).

O estágio III Caracteriza-se por perda da consciência e depressão progressiva do sistema nervoso central, chegando até a parada respiratória. Classicamente, em função dessa depressão é que se determinam quatro planos, conhecidos como planos cirúrgicos (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020). Ver vídeo 1 com a demonstração dos estágios anestésicos em um rato.

1.º Plano: Este plano caracteriza o início dos planos cirúrgicos. Nesse plano ocorre a normalização da respiração, que se torna rítmica, costoabdominal, de menor frequência e maior amplitude; mas ainda está presente o reflexo da cauda e outros reflexos (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020).

2.º Plano: Neste plano a respiração abdominocostal, porém profunda e rítmica, com redução gradual do volume corrente (VT) e da frequência respiratória. O estímulo doloroso cirúrgico causa uma discreta liberação de catecolaminas, elevando as frequências respiratórias e cardíaca, bem como a pressão arterial de maneira insignificante; já ocorre a ausência do reflexo da cauda e, às vezes, do palpebral (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020).

3.º Plano: Neste plano a respiração é superficial abdominocostal; inspiração curta; volume corrente e frequência respiratória reduzidos; silêncio abdominal; todos os reflexos referentes à sensibilidade (interdigital, caudal, palpebral e corneano) ausentes. Este plano só é requerido em cirurgias nas quais se exploram cavidades abdominais ou torácicas, quando é necessário o maior relaxamento muscular possível (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020).

4.º Plano: Respiração apenas diafragmática, taquipnéia e superficial; ocorre paralisia da musculatura intercostal e abdominal; volume corrente reduzido; acidose respiratória acentuada; córnea seca e sem brilho; início de apnéia e cianose por hipoventilação (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020).

O estágio IV é o mais crítico de todos os anteriormente citados, pois é nele que se observam abolição ou diminuição de certos reflexos, além de eventual parada respiratória e cardíaca que, se não socorrida em segundos, levará fatalmente o animal à morte (DOUGLAS, 1958; SIDDIQUI e KIM, 2020).

Após o término do procedimento cirúrgico foi aplicado anti-inflamatório não esteroideal Meloxicam na dose 0,5mg/Kg via SC e antibiótico Enrofloxacino na dose 11mg/Kg via SC. O Meloxicam é um derivado do oxicam que desenvolve uma atividade inibitória preferencial sobre a ciclooxigenase-2 (COX-2) na cascata da prostaglandina e tem capacidade de fornecer analgesia pós-operatória eficaz por até 24 horas após a aplicação (CLARK, Terrence P., 2006). A enrofloxacina, também conhecida como etil ciprofloxacina, é uma fluoroquinolona de terceira geração sintetizada quimicamente. Apresenta boa atividade antibacteriana contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e micoplasma. A vantagem da enrofloxacina é que ela possui amplo espectro de ação antibacteriana, forte poder bactericida, ação rápida, ampla distribuição no corpo, além disso, a enrofloxacina, como fármaco fluoroquinolona para animais, mata as bactérias ao replicar o DNA das bactérias do tecido (PEI e colab., 2020).

Vídeo 1: Demonstração dos estágios anestésicos em um rato.

Link: <https://youtu.be/12f2LiY34fo>

Fonte: Elaboração própria.

2.4.4 Analgesia pós-operatória

O controle da dor é de grande importância para o refinamento dos experimentos com animais. É amplamente recomendado que os animais submetidos a procedimentos cirúrgicos ou outros procedimentos potencialmente dolorosos recebam a devida analgesia (SNEDDON, 2017). A necessidade de controlar a dor, principalmente em animais usados em pesquisas, não se dá apenas por razões éticas, mas também pelos efeitos que a dor pode ter sobre o valor dos modelos animais usados. Juntamente com o estresse cirúrgico, a dor pode resultar em uma grande resposta ao estresse endócrino, pode causar diminuição da motilidade intestinal e retenção urinária, pode prejudicar a função respiratória e pode produzir alterações de longo prazo no sistema nervoso central em humanos e animais (RAWAL, 2016)

Além disso, em roedores de laboratório, a dor pode diminuir o consumo de comida e água e pode reduzir atividades como higiene pessoal (SNEDDON, 2017). O agente usado deve ser selecionado com base no grau estimado de dor e nos requisitos do protocolo de pesquisa específico. Os opioides geralmente são necessários para controlar a dor intensa, enquanto os AINEs podem ser suficientes para a dor leve a moderada. O

uso de analgésico preventivo é recomendado, principalmente quando se usa AINEs, mas se opioides são usados, as taxas de dose dos anestésicos normalmente devem ser reduzidas. Deve-se considerar também o uso de protocolos analgésicos multimodelos, envolvendo combinações de várias classes de analgésicos (GORSKY, 2019; RICHARDSON, Claire A. e FLECKNELL, 2005).

Visto isso, foi realizado como medicação pós-operatória, com início 12 horas após o término da cirurgia, a aplicação de Meloxicam via SC, na dose de 1mg/Kg, a cada 24 horas por 3 dias e aplicação de Cloridrato de Tramadol pela via SC, na dose de 12,5mg/Kg a cada 12 horas por 3 dias.

2.5 Protocolo anestésico em ratos

Os Equipamentos de proteção individuais (EPIs) constam na Tabela 1, os matérias utilizados constam na Tabela 2 e os fármacos e suas devidas apresentações constam na Tabela 3.

- 1- Utilize todos os EPIs recomendados.
- 2- Antes de remover os animais de suas caixas, realiza uma inspeção dos animais e avalia seu comportamento. Após isso, retire o animal da caixa e afira sua temperatura.
- 3- Coloque o animal em uma balança com tara e determina sua massa corporal.
- 4- Calcule a dose apropriada para cada medicamento conforme Tabela 4.
- 5- Aspire o volume calculado para cada medicamento, para isso usa uma seringa de 1 mL com a agulha 26G. Atenção, usar agulhas diferentes para aspirar a medicação do frasco e injetar no animal, caso o frasco tenha uma tampa de silicone ou borracha que necessite de ser perfurada com a agulha.
- 6- Determine previamente os locais do corpo do animal aos quais serão realizadas a aplicação das injeções. O presente trabalho optou por realizar as injeções conforme consta na figura 1. Esse procedimento é importante para caso ocorra alguma reação no local de alguma injeção, o pesquisador saberá qual substância foi introduzida naquele local.
- 7- Contenha o animal manualmente ou com o auxílio de um contensor comercial para ratos e aplique o Sulfato de Morfina pela via SC. Realize a antisepsia prévia da região com álcool etílico em concentração de 70%. Após realizada a

- administração do medicamento, coloque-o em uma caixa sozinho. Na caixa pode conter alimento e água disponíveis a vontade.
- 8- Após 10 minutos, contenha o animal novamente e administre Acepromazina por via IM. Realize a mesma a antissepsia descrita anteriormente. Retorne o animal para caixa após a aplicação.
 - 9- Após 10 minutos, contenha o animal pelo dorso e realize a antissepsia do abdômen com álcool etílico em concentração de 70%. Introduza a agulha da seringa contendo Cloridrato de Lidocaína sem vasoconstritor e aplique a injeção IP no quadrante inferior direito do animal, lado esquerdo do operador. Retorne o animal para caixa após a aplicação.
 - 10- Após 10 minutos, realizar o mesmo procedimento para injeção via IP no animal e aplicar a solução envolvendo Cetamina e Xilazina na mesma seringa, via IP. Aplicar sobre o mesmo local onde anteriormente foi administrada a Lidocaína.
 - 11- Retornar o animal para caixa e observá-lo enquanto ele passa pelos estágios anestésicos, ver Vídeo 1. Quando o animal não apresentar mais o reflexo caudal, iniciar o preparo para o ato cirúrgico.
 - 12- Fica sugerido que caso necessário, o reforço anestésico seja utilizado quando o animal apresente algum tipo de reatividade, e este seja equivalente a 1/4 da dosagem inicial de Cetamina pela via IP.
 - 13- Aplicar pomada oftálmica composta por hialuronato de sódio 0,2% nos olhos do animal, para evitar ressecamento da córnea podendo causar ceratite ou ulceração devido à falta de reflexo de piscar.
 - 14- Antes de iniciar o procedimento cirúrgico, deve-se preparar um local com superfície aquecida com a finalidade de evitar hipotermia. O animal deve ficar protegido do contato direto da superfície de aquecimento para evitar queimaduras, deve-se ter atenção especial com as orelhas dos animais para não se queimarem nesse processo, bem como atenção especial em relação à temperatura a qual o animal será submetido.
 - 15- Após o término do procedimento cirúrgico, aplicar via SC com a devida antissepsia, o anti-inflamatório Meloxicam e o antibiótico Enrofloxacin. Ambos os medicamentos devem ser aplicados em sítios diferentes e com seringas diferentes.

Analgesia pós-operatória:

- 1- Após 12 horas, aplicar por via SC Meloxicam e Cloridrato de Tramadol. Ambos os medicamentos devem ser aplicados em sítios diferentes e com seringas diferentes. A aplicação do tramadol deve ser repetida a cada 12 horas durante 3 dias e a aplicação do Meloxicam a cada 24 horas durante 3 dias.

Tabela 1: Lista de EPIs utilizados para o procedimento anestésico em ratos

EPI

Óculos de proteção

Máscara cirúrgica descartável cobrindo boca e nariz

Luva de látex

Jaleco de manga longa

Touca descartável

Propé descartável

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2: Lista de materiais utilizados para o procedimento anestésico em ratos

Material	Fabricante
Seringas descartáveis com agulha, 1mL 13x0,45mm 26G 1/2	Descarpack descartáveis do Brasil Ltda
Termômetro digital infravermelho sem contato G-Tech	ACCUMED PRODUTOS MEDICO HOSPITALARES LTDA
Balança Digital com graduação de 1 em 1 grama	Casita

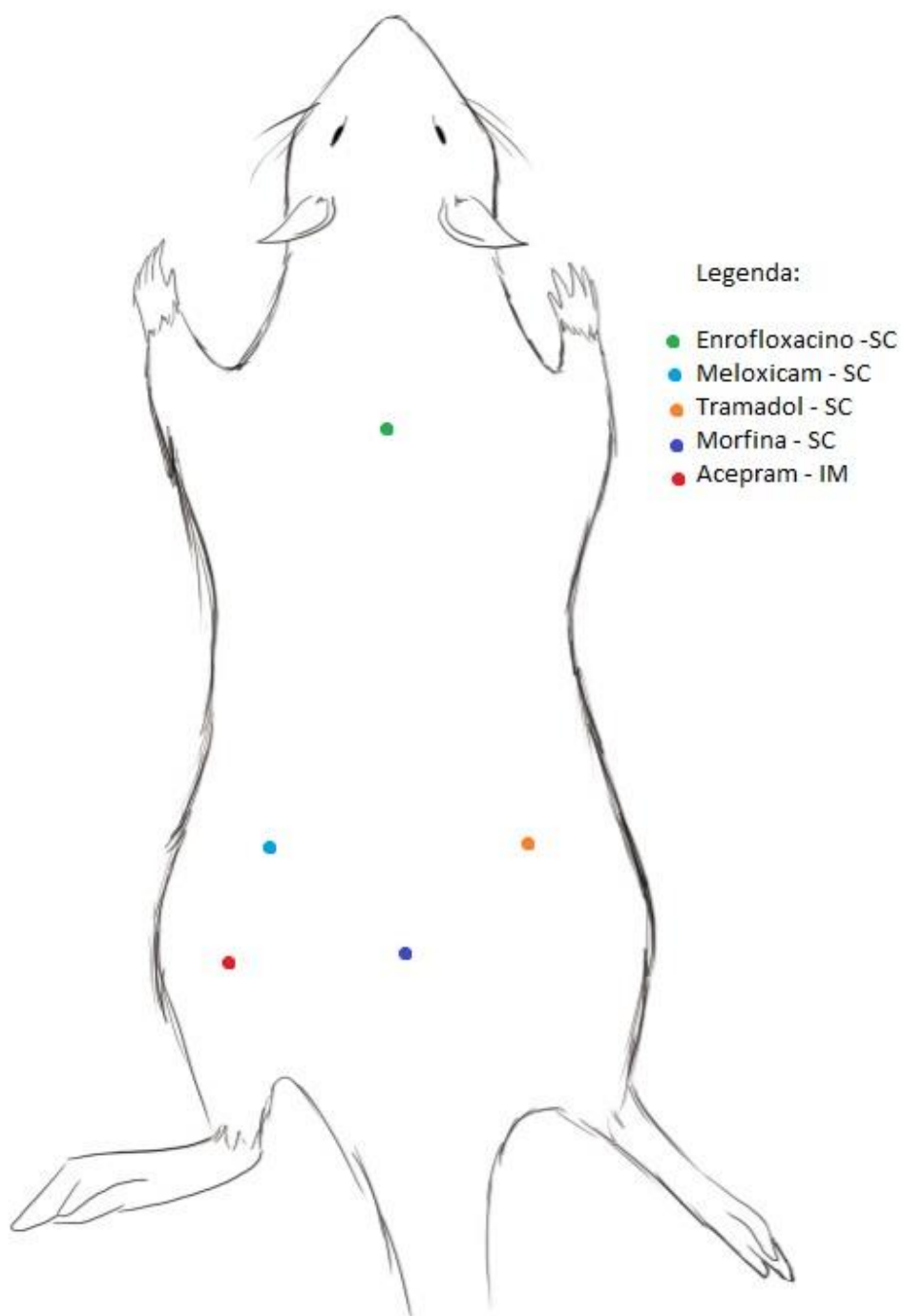
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3: Lista de fármacos utilizados para o procedimento anestésico em ratos

Fármaco	Apresentação	Fabricante
Cloridrato de Tramadol	100mg/2mL	Laboratório Teuto Brasileiro S/A
Cloridrato de Lidocaína sem vasoconstritor	20mg/mL 20mL	Hypofarma instituto de hypodermia e farmacia Ltda
Sulfato de Morfina	1,0mg/mL	Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda
Acepromazina	0,2% 20mL	Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários Ltda
Meloxicam	0,2% 20mL	Agener União Saúde Animal Ltda
Enrofloxacina	10% 50mL	Fabiani Saúde Animal
Hialuronato de sódio	Pomada oftálmica - 0,2%	FBM FARMA

Fonte: Elaboração própria.

Figura 1: Padronização dos locais de administração dos fármacos nos animais.



Fonte: Elaboração própria.

2.6 Considerações finais

A anestesia em animais de laboratório, sobretudo roedores, é um desafio especial aos pesquisadores que utilizam esses animais em seus experimentos. Sabe-se que o risco é inerente a todos os métodos de anestesia, porém, nesse animal em especial, não é possível a utilização dos mesmos empregados em animais maiores. Os métodos capazes de reduzir os riscos anestésicos e melhorar a capacidade de monitorização dos animais maiores durante a anestesia são em muitos casos inviáveis tecnicamente, ineficientes ou impraticáveis de serem realizados nos roedores.

Dessa forma, a seleção adequada dos agentes anestésicos, bem como a via de administração adequada e as doses apropriadas, são fundamentais para uma anestesia segura, eficaz e capaz de reduzir os riscos desnecessários de óbito desses animais de experimentação. Essas medidas favorecem uma recuperação mais rápida e segura dos animais, o que contribui para o bem-estar animal associado ao desenvolvimento científico de forma sustentável. Para facilitar a reprodutibilidade da técnica demonstrada, a ficha de procedimento individualizada para controle do volume e horário de aplicação das drogas consta na tabela 4.

Tabela 4: Ficha de procedimento individualizada

Tabela 04: Ficha de procedimento individualizada									
Data:	Via	Grupo:	Concentração	Dose	Peso:		Temperatura animal:		
					Volume (mL)	por grama do animal	Volume aplicado (mL)	Horário da aplicação	Observação
Sulfato de Morfina	SC	2,5mg/Kg	10,0mg/mL	0,00025mL	0,00025xPeso(g)				Administrar 30 minutos antes da cirurgia
Meloxicam	SC	1mg/Kg	2mg/mL	0,0005mL	0,0005xPeso(g)				Administrar após a cirurgia
Acepromazina	IM	0,5mg/Kg	2mg/mL	0,00025mL	0,00025xPeso(g)				Administrar 20 minutos antes da cirurgia
Cloridrato de Lidocaina sem vasoconstritor	IP	1,5mg/Kg	5mg/mL	0,0003mL	0,0003xPeso(g)				Diluir para cada 0,25mL da Lidocaina da tabela 01 em 0,75mL de SF. Aguardar 10 minutos para aplicação do anestésico geral IP.
Cetamina	IP	30mg/Kg	100mg/mL	0,0003mL	0,0003xPeso(g)				Administrar Cetamina e Xilazina em conjunto na mesma seringa
Xilazina	IP	5mg/Kg	20mg/mL	0,00025mL	0,00025xPeso(g)				Administrar Cetamina e Xilazina em conjunto na mesma seringa
Enrofloxacina	SC	11mg/Kg	100mg/mL	0,00011mL	0,00011xPeso(g)				Aplicar uma dose após o término do procedimento cirúrgico.
Medicação pós-operatória									
Meloxicam	SC	1mg/Kg	2mg/mL	0,0005mL	0,0005xPeso(g)				Medicação pós-operatória: Aplicar a cada 24 horas por 3 dias
Cloridrato de Tramadol	SC	12,5mg/Kg	50mg/mL	0,00025mL	0,00025xPeso(g)				Medicação pós-operatória: Aplicar a cada 12 horas por 3 dias

Fonte: Elaboração própria.

3. CAPÍTULO III: DESCRIÇÃO DE UM MÉTODO DE OVÁRIO-SALPINGO-HISTERECTOMIA EM RATAS COMO MODELO PARA INDUÇÃO DE OSTEOPOROSE PÓS-MENOPÁUSICA

3.1 Introdução

A osteoporose é a doença óssea mais comum em humanos, representando um grande problema de saúde pública. É mais comum em caucasianos, mulheres e pessoas idosas. Tal doença esquelética afeta um número enorme de pessoas, de ambos os sexos e todas as raças, e sua prevalência aumenta à medida que a população envelhece. É uma doença silenciosa que geralmente só é percebida pelos pacientes quando as fraturas ocorrem (SÖZEN e colab., 2017). As fraturas resultantes estão associadas à redução da qualidade de vida e significativa morbidade, mortalidade e utilização de recursos de saúde (KANIS e colab., 2017).

A osteoporose pós-menopáusica é uma doença crônica e muitas vezes assintomática na maioria das mulheres, o que torna a pesquisa epidemiológica especialmente difícil. A determinação, com precisão, da prevalência de osteoporose é uma tarefa complicada, sobretudo no Brasil, um país grande, com características extremamente diversas de região para região. Nos últimos anos, foram feitos esforços para melhor compreender a epidemiologia da osteoporose pós-menopausa e para mensurar os custos diretos e indiretos da doença para o sistema de saúde brasileiro (BACCARO e colab., 2015) Um modelo animal de osteoporose pós-menopáusica pode ser definido como um modelo no qual se possa estudar, em um animal vivo, a perda óssea espontânea ou induzida devido a deficiência hormonal ovariana e no qual as características da perda óssea e suas sequelas se assemelham àquelas encontradas em mulheres na pós-menopausa em um ou mais aspectos (KALU, 1991a). Nesse sentido, a seleção de um modelo animal adequado é difícil. Muitos fatores devem ser considerados ao discutir os possíveis modelos para a osteoporose, e os principais fatores a serem observados são a conveniência a relevância (comparabilidade com a condição humana) e a adequação (KALU, 1991a; TURNER, A. Simon, 2001).

O modelo de ratas ovariectomizadas se adequa a esses fatores e possui uma semelhança com os humanos com relação à fisiopatologia relacionada à deficiência de estrogênio, uma vez que apresenta prevenção da perda óssea e aumento na renovação

óssea quando tratados com reposição de estrogênio. Este é considerado como um modelo padrão ouro de osteoporose humana (COLMAN, 2003; KALU, 1991a; TURNER, A. Simon, 2001).

Assim exposto, é de grande importância a padronização e a descrição detalhada de técnicas que visem a remoção das gônadas das ratas para a indução da osteoporose pós-menopáusicas. As principais técnicas descritas visam a remoção apenas dos ovários (ovariectomia ou ooforectomia) e a realização desses procedimentos cirúrgicos são descritas principalmente como três tipos principais de incisão. As técnicas mais descritas envolvem uma incisão cutânea única dorsal na linha média, incisões duplas dorsolaterais e uma técnica envolvendo uma incisão transversal realizada na parte média do abdome (KHAJURIA e colab., 2012; LASOTA e DANOWSKA-KLONOWSKA, 2004; PARHIZKAR e colab., 2008).

Este estudo concentrou-se na descrição de um método novo de ovário-salpingo-histerectomia (OSH), o qual se trata de um procedimento cirúrgico para a retirada cirúrgica de ovários, tubas uterinas e útero, por meio de uma incisão mediana retro-umbilical. A retirada cirúrgica apenas dos ovários mantém o útero, que fica sem função e predisposto a patologias decorrentes da deficiência hormonal. Sabe-se que os hormônios ovarianos têm influência na sinalização de moléculas de insulina no útero, bem como o estrogênio afeta os relógios moleculares nesse órgão e afeta também a expressão de proteínas no útero relacionadas à ação do hormônio tireoidiano (KORICANAC e colab., 2008; NAKAMURA e colab., 2008; SAYEM e colab., 2018). Portanto para estudos nos quais os animais ficarão um longo período vivos após a cirurgia e que o útero ou tubas uterinas não fariam parte das análises experimentais, essa seria uma técnica cirúrgica viável de ser realizada.

Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico de ovário-salpingo-histerectomia para a realização de um estudo envolvendo a avaliação da densidade mineral óssea em um modelo animal de osteoporose pós-menopáusicas. Portanto de acordo com os princípios de “redução, substituição e refinamento” no uso de animais, conhecido como Princípio dos 3R’s, tal trabalho é importante, pois promove a redução do uso de animais ao compartilhar os mesmos animais em diferentes estudos científicos e contribui também para o refinamento dos protocolos cirúrgico experimentais. Além disso, incentiva e promove a realização de cirurgias mais seguras e de forma asséptica o

que evita o surgimento de infecções e mortes desnecessárias (RUSSELL e BURCH, 1959).

3.2 Métodos

O estudo foi conduzido conforme o descrito no Capítulo II, item 2.2.

3.2.1 Pré-operatório

Uma das principais etapas da realização de cirurgia experimental é o planejamento cirúrgico. Nessa fase se deve fazer um levantamento de todo o material que será necessário durante o procedimento e deve ser realizado o preparo técnico da equipe. Para a realização desse protocolo cirúrgico, o cirurgião realizou treinamento da técnica cirúrgica em 30 cadáveres de ratas, fornecido pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto.

Inicialmente foi realizada uma avaliação dos animais conforme descrito no Capítulo II, item 2.4.1 e realizada a medicação pré-anestésica conforme item 2.4.2 e a anestesia conforme item 2.4.3.

Com o animal já anestesiado, teve início a preparação para o ato cirúrgico por meio da tricotomia e antissepsia do campo operatório. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, sobre uma superfície plana e com inclinação de 30 a 45°. A inclinação se faz importante para facilitar a respiração dos animais durante o ato cirúrgico. Os animais receberam aquecimento térmico por meio de uma placa de aquecimento que ficava sobre a superfície plana a qual os animais estavam apoiados. Entre os animais e a placa de aquecimento foram colocadas duas compressas cirúrgicas dobradas para evitar eventuais queimaduras, uma atenção especial foi tomada para evitar que as orelhas não entrassem em contato direto com a placa, uma vez que são mais sensíveis ao estresse térmico, já que não possuem a mesma cobertura pilosa do corpo.

Para manter os animais estáveis em decúbito dorsal, foi colocada uma compressa cirúrgica enrolada em cada lado do animal, para que fizesse o papel de uma calha, conforme figura 2. Com o animal devidamente posicionado, iniciou-se a tricotomia

ampla por toda a região abdominal, por meio da aplicação de creme depilatório Veet® para peles delicadas, a aplicação do produto foi de acordo com as instruções do fabricante, conforme figura 3.

Após a tricotomia teve início a antissepsia da região com digliconato de clorexidina solução com tensoativos 4% para ação degermante, e posterior aplicação de digliconato de clorexidina solução alcoólica 0,5% para preparo do campo operatório e para antissepsia da pele. O cirurgião também realizou a antissepsia cirúrgica ou preparo pré-operatório das mãos com a utilização de Digliconato de Clorexidina Solução com tensoativos conjunto Escova-Esponja 2% e após esse preparo utilizou luvas cirúrgicas estéreis para realização da operação. Após o preparo foi colocado os panos de campo operatório esterilizados, conforme figura 4.

Figura 2: Posicionamento em decúbito dorsal



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 3: Aplicação do creme para remoção dos pelos



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 4: Campo operatório preparado



Fonte: Registro fotográfico próprio.

3.2.2 Técnica operatória

Inicialmente deve-se localizar a sínfise púbica, a incisão deve terminar aproximadamente 1,5 centímetros cranialmente a ela. A abordagem foi feita por meio de uma incisão mediana retro-umbilical de aproximadamente 2 centímetros, com o auxílio de uma lâmina de bisturi descartável em aço carbono número 15, conforme figura 5. A incisão pode ser estendida cranialmente ou caudalmente para facilitar a exteriorização dos cornos uterinos sem que haja tração excessiva.

Após a incisão da pele a linha alba deve ser seccionada com o auxílio de uma tesoura cirúrgica 15cm reta fina/romba e pinça anatômica dente de rato 14 cm, com muito cuidado para não lesionar nenhum órgão. Após a abordagem da cavidade abdominal, o omento deve ser deslocado para cima afim de se identificar visualmente o útero, conforme figura 6. O útero das ratas é bicorno e pode ser distinguido dos intestinos pela sua coloração mais rósea. A cavidade abdominal dos animais deve ser manipulada com cuidado e foi realizada com o auxílio de uma pinça Adson 12 cm com serrilha e uma pinça hemostática Hasteld.

Após a localização do corno uterino, realiza-se sua exposição completa até a identificação do ovário. Com uma tração suave no sentido caudal e medial realiza-se a ruptura do ligamento suspensório do ovário e com o auxílio da pinça hemostática, realiza-se a hemostasia dos vasos ovarianos, os quais não necessitam de ligadura com fio cirúrgico. Realiza-se o mesmo procedimento para o ovário contralateral e assim é possível exteriorizar ambos os ovário e cornos uterinos da cavidade abdominal.

Feito isso, deve-se aplicar uma tração cranial no útero afim de expor o corpo e identificar a cérvix com o auxílio da palpação. Essa tração deve ser feita de forma bem suave para não romper as estruturas que são muito delicadas. Para evitar cortar o útero, o clampeamento não deve ser feito com a utilização da pinça hemostática. Dessa forma, realiza-se uma ligadura por transfixação sem a utilização das pinças nesse momento. Para a realização da ligadura, utilizou-se fio de sutura absorvível, monofilamento violeta Poliglecaprone 25 Caprofil™ 4-0, conforme conforme figura 7. Após a realização da ligadura, realiza-se o camplamento uterino com a pinça hemostática e depois a secção acima do camplamento com a utilização do bisturi ou da tesoura. O coto uterino então é recolocado na cavidade abdominal e realiza-se uma avaliação quanto a sangramentos antes de se iniciar o fechamento abdominal.

A sutura da musculatura abdominal foi realizada com fio de sutura não absorvível, monofilamento preto Nylon 4-0. Foi feita a sutura no padrão simples contínuo, conforme figura 8. Para a síntese da pele foi realizada uma sutura intradérmica também com fio de sutura não absorvível, monofilamento preto Nylon 4-0, conforme figura 9. A sutura intradérmica foi escolhida, em detrimento do padrão de sutura de pele simples separada, pois apresenta melhor coaptação das bordas da ferida cirúrgica, cicatrização mais rápida clinicamente e histologicamente além e melhor aspecto cosmético (GÁL e colab., 2009; GOULETSOU e colab., 2020). Ao término da sutura foi realizada limpeza da região operada com digliconato de clorexidina solução alcoólica 0,5%, o aspecto final pode ser observado na figura 10. Após o término do procedimento cirúrgico os animais foram mantidos aquecidos até recobrem os movimentos, receberam as medicações descritas no item 2.5 e foram mantidos isolados até a cicatrização da ferida cirúrgica. A demonstração de toda a técnica consta no vídeo 2.

Figura 5: Incisão de pele



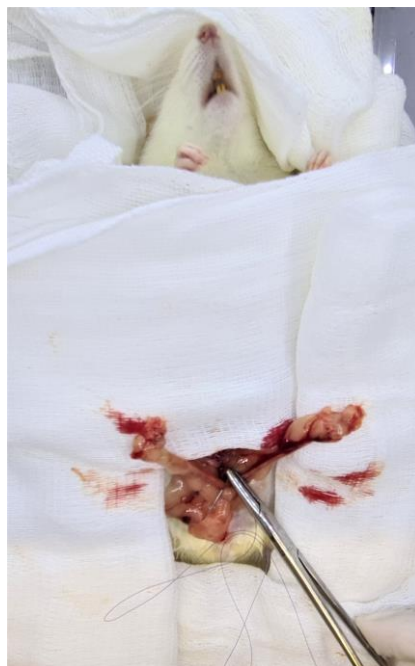
Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 6: Tração do omento



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 7: Exposição do ovário, cornos uterinos e transfixação para ligadura uterina



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 8: Síntese abdominal



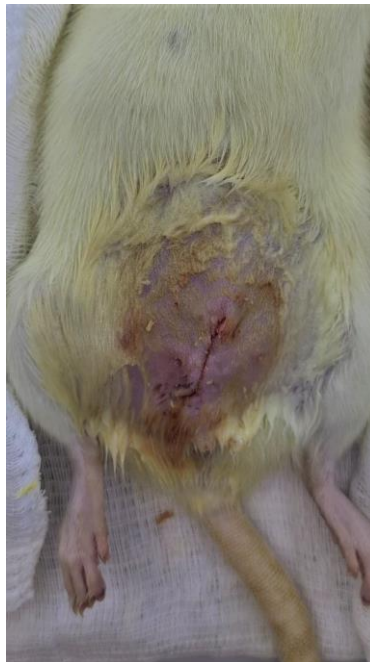
Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 9: Síntese intradérmica



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 10: Aspecto final pós-operatório imediato



Fonte: Registro fotográfico próprio.

3.5 Resultados

Vídeo 2: Demonstração de técnica de ovário-salpingo-histerectomia em rata



Link: <https://youtu.be/g2GndhrKIMY>

Fonte: Elaboração própria.

3.5.1 Duração da cirurgia

Foram operados 39 animais, sendo que desses animais 9 foram sham operados (uma falsa cirurgia que não remove os órgãos) e os demais 30 animais passaram pela ovário-salpingo-histerectomia. A média de tempo gasto na cirurgia dos animais operados foi de 23 minutos e o desvio padrão foi de 5 minutos. Já a média de tempo das cirurgias dos animais sham operados foi de 15 minutos e o desvio padrão de 1 minuto e 30 segundos.

3.5.2 Taxa de mortalidade

Um animal morreu durante o procedimento devido a lesão intestinal durante a secção da parede abdominal com a tesoura e outro animal morreu aproximadamente 12 horas após a cirurgia. A taxa de mortalidade dos 39 animais foi de 5,128%.

3.5.3 Tempo de cicatrização da ferida

Os animais apresentaram clinicamente um padrão de cicatrização da ferida cirúrgica 6 dias após o ato cirúrgico, conforme figuras 11 e 12.

3.5.4 Complicações

Nenhum dos animais apresentou qualquer sinal de infecção ou inflamação da ferida cirúrgica e nem tiveram deiscência ou autotraumatismo. Outras complicações que são esperadas no período intra ou pós-operatório não ocorreram mesmo 20 semanas após o ato cirúrgico.

Figura 11: Ferida cirúrgica 3 dias de pós-operatório



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 12: Ferida cirúrgica 6 dias de pós-operatório



Fonte: Registro fotográfico próprio

3.6 Discussão

O rato (espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar) foi usado nesse procedimento cirúrgico por ser considerado o modelo padrão ouro para indução de condições similares à osteoporose após a menopausa em humanos (KALU, 1991b; KOMORI, 2015).

A via de acesso abdominal foi escolhida por ser a principal via de acesso cirúrgico a cavidade abdominal e para alguns procedimentos cirúrgicos no retroperitônio (BATISTA e colab., 2008).

A remoção cirúrgica dos ovários, tubas uterinas e útero se mostraram seguras mesmo após um período longo de 20 semanas após o ato cirúrgico, o que coloca a cirurgia de OSH como uma técnica eficiente e segura para procedimentos experimentais que necessitem de um acompanhamento por um maior período dos animais.

O fechamento da parede abdominal é um procedimento no qual o cirurgião deve escolher um meio mecânico de manter a parede abdominal fechada até que o processo de cicatrização seja completo e forte o suficiente para manter a ferida cirúrgica fechada, ou seja, deve restituir a forma e função da parede abdominal após procedimento operatório (TOGNINI e GOLDENBERG, 1998). A sutura da parede abdominal foi realizada de forma contínua, pois é executada mais rapidamente do que a sutura da parede abdominal com pontos separados. Além disso, a sutura no padrão simples separado, comparada à sutura contínua, não apresenta diferença significativa na força de tração e na quantidade de colágeno no 14º dia de pós-operatório em ratos (TOGNINI e colab., 1997; TOGNINI e GOLDENBERG, 1998).

Cirurgias com acesso pela parede abdominal em animais costumam ter como um fator limitante a infecção do sítio cirúrgico e a automutilação, uma vez que o ato de lamber a região operada e até mesmo a remoção precoce dos pontos de pele, por parte dos animais, favorece a contaminação bacteriana da ferida. Essa técnica, por utilizar um padrão de síntese intradérmica, permitiu uma ótima coaptação e cicatrização da ferida, sem que os animais tivessem acesso ao fio cirúrgico. Além disso, os lábios da ferida cirúrgica não ficaram evertidos e não tiveram espaços mortos de permeio (região sem tecido após fechamento da ferida) mesmo sem a utilização de curativos compressivos. Tal padrão de síntese também não demonstrou comprometimento da cicatrização devido a mobilidade dos animais.

O fechamento bem-sucedido da parede abdominal deve restaurar sua forma e função após uma intervenção cirúrgica e prevenir possíveis complicações. Deve ser confortável para o paciente e deixar uma cicatriz esteticamente aceitável (BATISTA e colab., 2008; TOGNINI e colab., 1997; TOGNINI e GOLDENBERG, 1998).

A cicatriz observada era linear e não apresentava marcas ou sinais laterais como geralmente ocorre após a síntese de pele no padrão simples separado. Os animais não demonstraram interesse em lambem ou morder a região operada e nenhum animal teve deiscência, cura retardada da ferida, abscesso, infecção ou automutilação.

O tempo para execução desse procedimento cirúrgico é um dos inconvenientes dessa técnica de OSH pela via abdominal (23 ± 5 min), mas pode ser reduzido pela habilidade do cirurgião. Em um estudo, as técnicas de ooforectomias foram comparadas quanto ao tempo de duração da cirurgia e os resultados foram os seguintes: ooforectomia precedida por uma única incisão cutânea dorsal na linha média ($15,52 \pm 0,30$ min), ooforectomia feita com duas incisões dorsolaterais ($9,65 \pm 0,86$ min) e ooforectomia precedida por incisão transversal realizada na parte média do abdome, ligeiramente lateralizada para a direita ($7,55 \pm 0,11$ min) (KHAJURIA e colab., 2012).

A taxa de mortalidade encontrada com essa técnica se mostrou abaixo daquela descrita na literatura e foi de 5,128%, enquanto a mortalidade descrita em um estudo cuja ooforectomia foi realizada por meio de incisões em cada lado do abdômen (entre a última costela e o quadril) foi de 25%, sendo que outros 12,5% dos animais do experimento foram descontinuados devido a automutilação da ferida cirúrgica (BAZZIGALUPPI e colab., 2018). Experimentos com uma menor taxa de mortalidade dos animais requerem um menor número de animais a serem utilizados, o que é extremamente favorável aos princípios dos 3Rs, em especial o princípio que se refere a reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

O tempo de cicatrização da ferida também teve um resultado extremamente positivo ao se comparar com outras técnicas. Os animais desses experimento demonstraram clinicamente uma ferida bem cicatrizada já com 6 dias de pós-operatório e o tempo médio em dias descrito em outro estudo foi de: 11 dias para os animais que passaram por ooforectomia precedida por uma única incisão cutânea dorsal na linha média, 9 dias para os animais que passaram por ooforectomia feita com duas incisões dorsolaterais e 8 dias para os animais que passaram por ooforectomia precedida por

incisão transversal realizada na parte média do abdome, ligeiramente lateralizada para a direita (KHAJURIA e colab., 2012).

3.7 Conclusão

Pode-se concluir que a técnica de OSH pela via abdominal é uma alternativa cirúrgica eficaz e segura para a remoção das gônadas de ratas, além disso demonstra uma baixa taxa de mortalidade, uma boa cicatrização da ferida, não demonstrou grandes complicações no pós-operatório imediato ou tardio. É uma técnica que está de acordo com o princípio dos 3Rs e pode ser utilizada como modelo para a indução de osteoporose pós-menopáusia, uma vez que assim como a ooforectomia também remove completamente os ovários e, além disso, se demonstrou uma técnica segura para experimentos longos como aqueles com 20 semanas de duração após a realização da cirurgia.

4.0 CAPÍTULO IV: INTERFERÊNCIA DA ACUPUNTURA E DA ADMINISTRAÇÃO DE 17 BETA-ESTRADIOL NA MASSA CORPORAL DE RATAS SUBMETIDAS A OVÁRIO-SALPINGO-HISTERECTOMIA

4.1 Introdução

A acupuntura tem suas raízes na mitologia do pensamento Taoísta e da China antiga e suas origens perdem-se na pré-história chinesa. Cerca de 3000 anos antes de Cristo (a.C.) já eram utilizadas agulhas de pedra e de espinha na China. O texto mais antigo é o Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo (Huang Ti Nei Ching), texto clássico e fundamental da Medicina Tradicional Chinesa, que descreve aspectos anatômicos, fisiológicos, diagnósticos e terapêuticos das moléstias. A versão final desse material data por volta do século I a.C. Tal clássico abrangeu diversos setores da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) incluindo a moxabustão, a acupuntura e as ervas. A nomenclatura dos pontos de acupuntura e a descrição mais detalhada de suas funções foram estabelecidas no livro O Clássico da Acupuntura (Zhen Jiu Jia Jing), por volta de 259 depois de Cristo (d.C.) (MACIOCIA e MING, 1996).

Os antigos médicos chineses desenvolveram, inicialmente, o sistema da acupuntura dentro da estrutura filosófica e cultural do Taoísmo, um sistema que significa submeter-se aos impulsos espontâneos da natureza essencialmente própria de uma pessoa e alcançar a unidade com o Tao (direção), o padrão-base do universo, uma força abstrata responsável pela criação, interligação, mudança e desenvolvimento em todas as coisas. Essa filosofia de “ir com o fluxo” é muito tentadora para as pessoas que se sentem presas no ambiente de grande pressão do Ocidente, o que em parte explica o crescimento da popularidade de terapias como a acupuntura, que são consideradas como de “volta à natureza” (ERNST, 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou o documento “Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005”, no qual estimula, de forma integrada às técnicas da medicina ocidental modernas, o uso da Medicina Tradicional / Medicina Complementar / Alternativa nos sistemas de saúde e preconiza o desenvolvimento de políticas observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso. Com base nisso, o Ministério da Saúde, por meio da portaria nº 971 de 3 de Maio de 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro. Nessa política nacional, a acupuntura é considerada como uma tecnologia de intervenção em saúde, inserida na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), sistema médico complexo, que aborda de modo integral e dinâmico o processo saúde-doença no ser humano, podendo ser usada isolada ou de forma integrada com outros recursos terapêuticos (“Ministério da Saúde Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares PMNPC Resumo executivo Brasília, fevereiro de 2005”, [S.d.]; OMS, 2005).

Acupuntura é um dos métodos mais antigos de terapia Chinesa. O termo *acupuncture* vem do Latim, *acus* que significa agulha e *pungere* que significa perfurar. Esse método implica em furar / atravessar a pele com agulhas específicas em locais determinados do corpo, chamados *pontos de acupuntura*, com a finalidade de prevenir ou tratar doenças. Os pontos de acupuntura são chamados de *shu-xue* em Chinês. *Shu* significa transportar, distribuir ou comunicar-se; *xue* se refere a um buraco ou depressão. Portanto, acupontos são os locais especiais onde a energia dos canais de acupuntura se manifesta na pele e se comunica com o restante do corpo (ALTMAN, 1998).

O tratamento com acupuntura ocorre após a realização do diagnóstico clínico, que pode ser tanto de acordo com o diagnóstico pela MTC quanto um diagnóstico de acordo com a medicina atual. Feito o diagnóstico, os pontos escolhidos, a profundidade da inserção da agulha, a técnica de estimulação aplicada nas agulhas, assim como a duração de cada sessão e o tempo de tratamento varia de acordo com as condições que serão tratadas (ALTMAN, 1998).

A teoria clássica da acupuntura reconhece 365 acupontos no caminho dos meridianos energéticos. São 14 (quatorze) canais ou meridianos regulares. Com a inclusão de pontos mistos ou extras e novos pontos utilizados na acupuntura da orelha (auriculopuntura) o total de pontos tem crescido para pelo menos 2000 (dois mil) que podem ser usados (KAPTCHUK, 2002; XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

A resposta inicial experimentada com a inserção da agulha de acupuntura é chamada de "De Qi" significando "a chegada do Qi" ou "a chegada da energia ao ponto de acupuntura". Nesse contexto, Qi pode ser interpretado como energia. O Qi consiste em todas as atividades vitais que incluem o espiritual, emocional, mental e aspectos físicos da vida. O Qi viaja por todo o corpo através de "meridianos". Os meridianos, ou canais de energia, são os mesmos nos dois lados do corpo (são pareados). Existem 14 meridianos principais, sendo 12 (órgãos) meridianos em cada metade do corpo e 2 meridianos não pareados, nas linhas médias. O ponto de acupuntura são locais específicos onde os meridianos vêm até a superfície da pele, e estão facilmente acessíveis à acupuntura e às demais técnicas explicadas anteriormente (MACIOCIA e MING, 1996).

Cada acuponto tem uma função definida e específica baseada na resposta do corpo. Alguns pontos podem ser usados sós, mas é mais comum usá-los em conjunto para alcançar o efeito esperado. O tratamento convencional pode envolver a utilização de poucas agulhas, como apenas uma, ou várias agulhas, como 20 (vinte) agulhas (XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

A maioria dos pontos de acupuntura está localizada em áreas de baixa resistência elétrica e alta condutância da pele. Mais profundamente no ponto, se encontram acumuladas as porções finais de nervos, pequenas arteríolas, veias, vasos linfáticos e mastócitos no tecido periférico. A estimulação desses pontos resulta na degranulação dos mastócitos, ativação da cascata inflamatória, alteração no fluxo sanguíneo e linfático e da condução dos impulsos nervosos ao sistema nervoso central. Esses

resultados levam a uma resposta local que se espalha ao longo do tempo por todo eixo neural invocando numerosas mudanças bioquímicas dentro do sistema nervoso, e, eventualmente por todo o corpo (EGERBACHER, 1971; XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

4.2 Objetivos

- Analisar a interferência da acupuntura e da administração de 17 beta-estradiol na massa corporal de ratas (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) submetidas a ovariário-salpingo-histerectomia.
- Descrever um protocolo experimental de contenção e aplicação de acupuntura em ratas (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar).
- Criação de aparato para a realização de acupuntura em modelo murino.
- Realizar a documentação fotográfica e por filmagem de todos os procedimentos descritos.

4.3 Justificativa

A menopausa e os eventos decorrentes dela, como a osteoporose pós-menopáusicas, sintomas vasomotores e alterações geniturinárias têm grande impacto na qualidade de vida da mulher e na saúde pública. À medida que a expectativa de vida se amplia, as mulheres passam mais tempo de suas vidas após a menopausa. Sabe-se que o tratamento hormonal com estrogênio continua sendo o tratamento mais eficaz para os sintomas vasomotores, síndrome geniturinária da menopausa e para prevenção da osteoporose, bem como prevenção de doenças crônicas em mulheres que apresentam menopausa prematura, seja por insuficiência ovariana primária ou por etiologias iatrogênicas (PACIUC, 2020).

Para mulheres que têm contraindicações à terapia com estrogênio ou que apresentam objeções pessoais, uma variedade de modalidades não hormonais pode ser oferecida para tratar os sintomas da menopausa locais e sistêmicos. Dessa forma, como a acupuntura é um tratamento complementar e que faz parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS, é relevante que se estude em um

modelo animal se o tratamento com acupuntura seria uma alternativa viável como auxiliar no tratamento das patologias associadas a esse período da vida da mulher.

4.4 Métodos

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) no protocolo CEUA nº 6126230419 (ID000208), ANEXO A.

O procedimento foi realizado em 39 ratas da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com média de 20,3 semanas de vida e desvio padrão de 1,537 semanas. Os animais tinham como peso médio 254,8 gramas e desvio padrão de 14,04 gramas. As ratas foram alojadas no Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP durante todo o período do experimento. As ratas foram mantidas em caixas de polipropileno com medidas de 49x34x21 centímetros de comprimento, largura e altura e na densidade de 4 a 5 animais por caixa no período anterior a cirurgia e na densidade de 2 a 3 animais por caixa após a cirurgia de OSH. As ratas foram mantidas em um ciclo de claro e escuro de 12 horas em ambiente sob temperatura (22-24°C), umidade (40-60%). A dieta utilizada foi a ração comercial para roedores da marca Nuvilab CR1 (Quimtia®) e a água foram ofertados *ad libidum*.

4.4.1 Delineamento experimental

O cálculo do número de animais foi realizado de acordo com a seguinte equação, sugerida pelo CEUA - UFOP:

$$n = 1 + [2C*(s/d)^2]$$

Na qual n é o número de animais.

C corresponde ao resultado da seguinte equação: $C = (z\alpha + z\beta)^2$

Para um poder do teste de 90% e nível de significância 0,05, $z\alpha$ é igual a 1,96 e $z\beta$ é 1,282. Logo o valor de C foi de $(1,96 + 1,282)^2 = 10,51$

Considerando ainda um desvio máximo (s) de 0,2 (20%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,5 (50%), ao aplicarmos a fórmula:

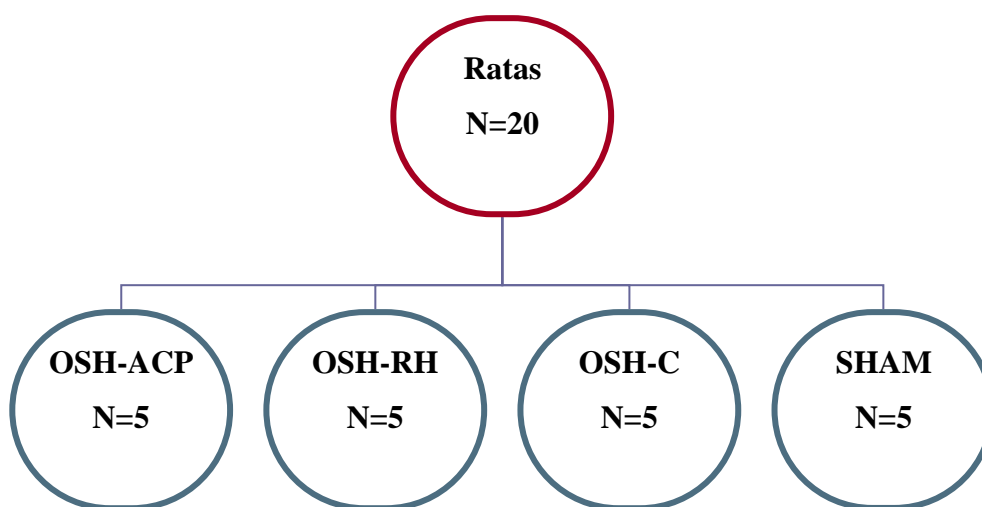
$$n=1+[2*10,51*(0,2/0,5)^2]$$

O resultado foi um n de 4,36 animais, o que arredondando-se para o próximo número inteiro foi de 5 animais por grupo.

Os animais foram recebidos após o desmame, com 21 dias de vida e mantidos no biotério sob os cuidados do executante do experimento até completarem em média 20 semanas de vida, com desvio padrão de 1,5 semanas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais antes da realização da primeira cirurgia de OSH, conforme organograma na figura 13 e 14.

- 1) Grupo formado por animais que passaram pela cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia e receberam tratamento com acupuntura (OSH-ACP n=5).
- 2) Grupo formado por animais que passaram pela cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia e receberam reposição hormonal com aplicações de 17 beta-estradiol via intramuscular na dose de 50 µg/Kg (OSH-RH n=5).
- 3) Grupo formado por animais que passaram pela cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia e não receberam mais nenhuma intervenção (OSH-C n=5).
- 4) Grupo formado por animais sham operados (foram anestesiados, tiveram a cavidade abdominal exposta e vísceras manipuladas mas não foi removido nenhum órgão, apenas um pequeno fragmento de tecido adiposo da região periovariana) (SHAM n=5).

Figura 13: Organograma dos grupos experimentais



Fonte: Elaboração própria.

4.4.2 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

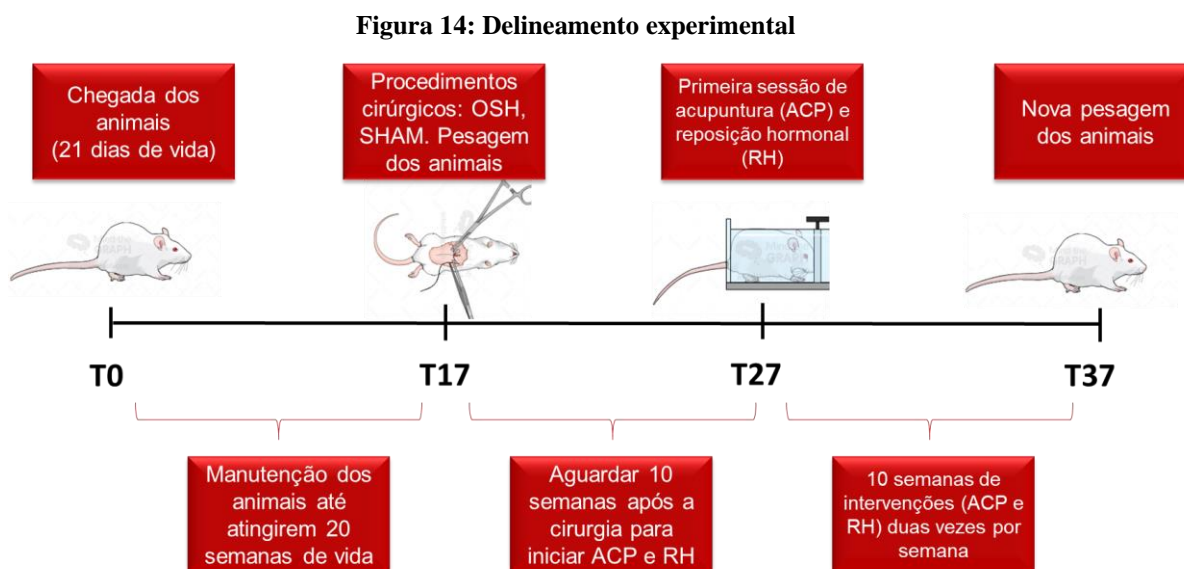
Os procedimentos anestésicos e cirúrgicos foram descritos nos capítulos 2 e 3.

4.4.3 Reposição hormonal de 17 beta-estradiol (RH)

Dez semanas após a cirurgia de OSH os animais do grupo OSH-RH começaram a receber duas aplicações semanais (as segundas e sextas-feiras) de 50 µg/Kg de massa corporal de 17 beta-estradiol injetável (*BOTUPHARMA*), pela via intramuscular na coxa direita, durante 10 semanas. O início do protocolo de reposição hormonal tardio foi realizado para que ocorresse uma perda de efeitos neuro-protetores do estrogênio, que foi demonstrado ocorrer em ratas 10 semanas após a remoção dos ovários (SUZUKI e colab., 2007).

Após três dias da última aplicação do hormônio os animais foram pesados em uma balança digital com graduação de 1 em 1 grama.

Ao final desta etapa do experimento os animais haviam sido acompanhados ao longo de 37 semanas e estavam com 40 semanas de vida ou 280 dias, conforme figura 14.



T0: Início da contagem do tempo. T17: 17 semanas de acompanhamento dos animais. T27: 27 semanas de acompanhamento dos animais. T37: 37 semanas de acompanhamento dos animais.

Fonte: Elaboração própria.

4.4.4 Procedimento de acupuntura

4.4.4.1 Contenção

Para a realização da aplicação das agulhas de acupuntura nos animais, foi necessária a realização de contenção mecânica das ratas, portanto foi desenvolvido um aparato de contenção com o objetivo de deixar expostos os locais de aplicação da acupuntura e conter o animal de uma forma confortável e segura. Antes de iniciar os procedimentos de contenção para a aplicação das agulhas, os animais passaram por um período de condicionamento e ambientação no uso do aparato de contenção.

Tal condicionamento foi realizado por 3 dias. No primeiro dia os animais eram encorajados a entrar e sair imediatamente do contensor. Após passarem três vezes pelo contensor os animais eram liberados. No segundo dia os animais deveriam entrar e ficavam restritos no contensor por 5 minutos. No terceiro dia os animais já deveriam ficar por 10 minutos dentro do contensor, mas ainda sem receber o agulhamento.

4.4.4. Confeção do aparato de contenção

Para a confecção do aparato de contenção, foi utilizado um pote plástico redondo, vendido como porta espaguete da marca Plasutil e com o código de referência 2618, conforme figura 15. O pote plástico transparente tinha as seguintes dimensões: Diâmetro x Altura: 7 centímetros x 28,3 centímetros e peso aproximado de 80 gramas.

As duas extremidades foram serradas manualmente, com o auxílio de uma serra de arco, em ambas as extremidades com a finalidade de reduzir o comprimento e permitir que o dispositivo tenha duas aberturas equivalentes. A altura final do dispositivo passou a ser de 20 centímetros.

Em uma das extremidades foi realizada duas aberturas ovais para que os animais pudessem ter seus membros posteriores expostos. Essas aberturas tiveram um diâmetro aproximado de 4 centímetros e tinham um distanciamento entre si, na parte inferior, de 1 centímetro.

Na parte superior às aberturas ovais para os membros inferiores, foi realizada uma abertura retangular com dimensões de 3,5 centímetros de comprimento e 4 centímetros de largura, para criar uma janela na qual fosse possível a introdução das agulhas de acupuntura nos pontos localizados na região dorsal do animal. Toda a

superfície serrada foi posteriormente lixada para não causar desconforto extra nos animais.

Na extremidade contralateral foi realizado um corte estreito e com 5 centímetros de comprimento para a introdução da unidade de fechamento frontal. O desenho esquemático do aparato de contenção para acupuntura em ratos consta na figura 16.

As unidades de fechamento, frontais e traseiras foram provenientes de um contensor comercial em acrílico, para ratos de 250 a 350 gramas, da marca Bonther.

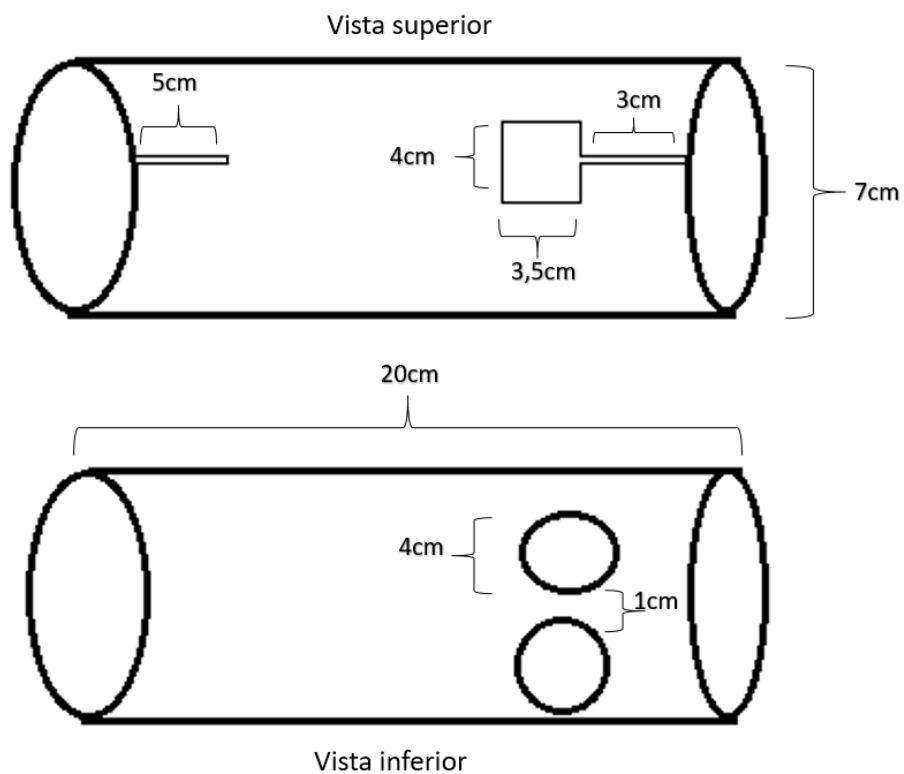
Esse contensor era então colocado em um suporte de madeira com duas abraçadeiras metálicas para fixá-lo e evitar que o mesmo saísse do lugar durante as sessões de acupuntura. As figuras 15 e 16 e o vídeo 3 demonstram o procedimento de contenção dos animais.

Figura 15: Pote plástico utilizado para fabricação do aparato de contenção



Fonte: <<https://www.vemquetemvariedades.com.br/produtos/pote-plastico-redondo-1-l-rosca-porta-espaguete-plasutil-2618/>>

Figura 16: Desenho esquemático do aparato de contenção para acupuntura em ratos



Fonte: Elaboração própria.

Figura 17: Aparato de contenção do animal para aplicação de acupuntura.

Vista lateral



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 18: Aparato de contenção do animal para aplicação de acupuntura. Vista superior.



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Vídeo 3: Demonstração de contenção de um rato para acupuntura



Link: <https://youtu.be/3W8knrcMym>

Fonte: Registro próprio.

4.4.4.2 Aplicação da acupuntura

A localização dos pontos de acupuntura é extremamente importante para que os efeitos no resultado terapêutico sejam alcançados bem como para a segurança do indivíduo que recebe o agulhamento. A descrição da localização dos pontos de acupuntura é feita de acordo com medidas proporcionais constantes entre os indivíduos. Por causa das diferenças de tamanho entre um indivíduo e o outro, e as diferenças entre as espécies, não é possível utilizar medidas absolutas como polegadas ou centímetros. Na prática da acupuntura, é comum usar a unidade “*cun*” para medir o corpo. O *cun* é uma unidade de medida relativa ou proporcional, usada para localizar os pontos de acupuntura e os meridianos. Nesse trabalho iremos adotar o comprimento da primeira vértebra caudal das ratas como sendo igual a um *cun* (XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

Outros aspectos fundamentais a serem considerados na prática da acupuntura se trata das dimensões das agulhas, a profundidade na qual a agulha foi inserida, o método de inserção e manipulação e a presença ou não do “*De Qi*” que significa “a chegada do *Qi* ou da energia no ponto. No presente trabalho todas as agulhas utilizadas foram descartáveis, da marca Dong Bang, cabo espiral inox, esterilizada com mandril de plástico, 0,25 x 30 milímetros. As agulhas foram inseridas com o auxílio de um mandril e na profundidade de 5 milímetros, perpendicularmente a pele e manipuladas com a técnica torção-rotação para tonificação do *Qi*. Em geral, a técnica tonificante é obtida quando se insere a agulha em um ponto com um movimento lento e suave de rotação ou torção de baixa amplitude, a rotação foi realizada em ambos os sentidos (horário e anti-horário)(MACIOCIA e MING, 1996).

Escolha dos pontos:

A escolha dos pontos teve como base o diagnóstico da moléstia provocada pela cirurgia de OSH, à luz da MTC. Inicialmente foi identificado o padrão da moléstia tendo como base os três pares de padrões básicos. Frio e calor, excesso e deficiência, colapso e rebelião. Conclui-se que a cirurgia de OSH induziu nos animais um padrão de deficiência. Após isso foi definido um método básico de tratamento com base nos seis métodos básicos de acupuntura, conhecidos como técnicas de tonificação, redução, aquecimento, resfriamento, ascensão e descida. O método de escolha para tratar um padrão de deficiência é o método de tonificação, pois como o objetivo terapêutico é

ajudar a trazer o paciente de volta ao equilíbrio e a escolha do método é tipicamente aquela que se opõe ao tipo de padrão (XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

O método de tonificação é chamado de *bu-fa* em chinês. *Bu* significa aumentar, reforçar e tonificar. *Fa* se refere a um método. *Bu-fa* pode reforçar e aumentar o *Qi*, o sangue, o *Yin* ou o *Yang* do corpo. Os sinais clínicos gerais de padrão de deficiência incluem fraqueza geral, anemia, intolerância a exercícios, falta de ar, fadiga, língua pálida e pulso fraco. Tais sinais são frequentemente vistos em pacientes geriátricos e também estão associados ao curso crônico da doença, como é o caso que foi provocado nos animais em experimentação após a cirurgia de OSH (XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

Nesse contexto, os pontos de acupuntura selecionados foram:

- Estômago 36 (E36) “*Zusanli*” (três milhas do pé) bilateralmente.
- Bexiga 23 (B23) “*Shenshu*” (ponto do rim) bilateralmente.
- Vaso Governador 3 (VG3) “*Yaoyangguan*” (portão do *Yang* lombar) ponto único.

O ponto E36 se localiza na face craniolateral do membro pélvico, 0,5 *cun* lateral à face cranial da crista tibial, no ventre do músculo tibial anterior; este é um ponto linear longo. É um ponto muito comumente utilizado e no contexto do presente trabalho tem como função atuar como tônico geral para o *Qi* (fortalecimento geral) (WEN, 2011; XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

O ponto B23 se localiza na face dorsolateral da coluna, 1,5 *cun* lateral à borda caudal do processo espinhoso de L2. É um ponto comumente utilizado principalmente para o tratamento da deficiência de *Yin* e *Qi* do rim, de acordo com a MTC a energia do rim controla os ossos. Por esse motivo o ponto foi utilizado, para posterior verificação das alterações relacionadas à osteoporose pós-menopáusia (WEN, 2011; XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

O ponto VG3 se localiza na linha média dorsal na maior depressão localizada entre o processo espinhoso dorsal da última vértebra lombar e primeira vértebra sacral. Utilizado para equilibrar a energia proveniente dos órgãos reprodutivos (WEN, 2011; XIE, Huisheng e PREAST, 2007).

A localização dos pontos é demonstrada nas figuras 17, 18, 19 e 20.

Aplicação das agulhas:

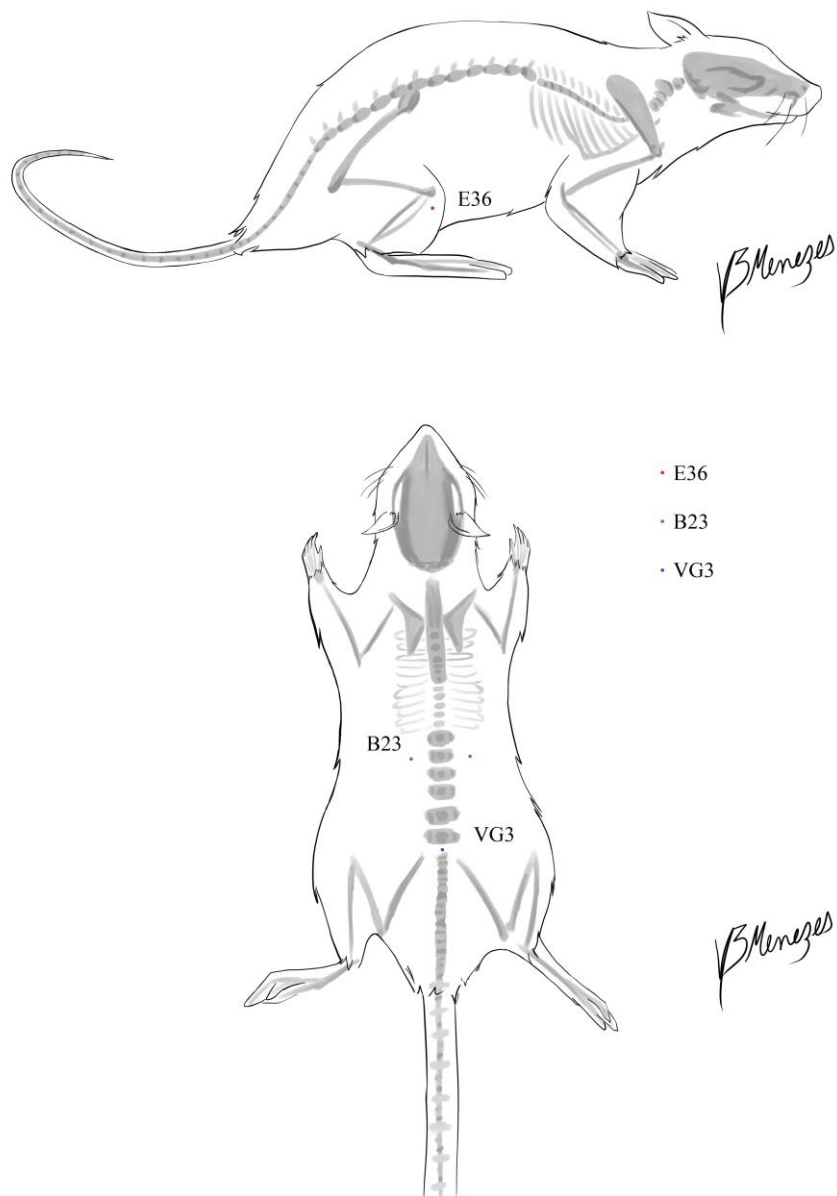
Dez semanas após a cirurgia de OSH os animais do grupo OSH-ACP começaram a receber duas aplicações semanais (as segundas e sextas-feiras) de acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3, durante 10 semanas. O início do tratamento e a periodização das sessões de acupuntura foi semelhante a realizada no grupo OSH-RH.

A aplicação das agulhas se iniciava após o devido posicionamento e contenção dos animais. Primeiro eram inseridas, com o auxílio do mandril, as agulhas no ponto E36, depois B23 e VG3. Após a inserção suave das agulhas, elas foram rotacionadas suavemente por 3 vezes, nas duas direções. Os animais permaneciam no contensor e com as agulhas durante 10 minutos. Caso uma agulha se desprendesse do animal antes do término dos 10 minutos, ela era recolocada uma única vez e estimulada novamente.

Após o término dos 10 minutos, as agulhas eram retiradas cuidadosamente e o animal retornava para a caixa na qual estava previamente. A demonstração do procedimento de acupuntura experimental nas ratas conta no vídeo 4.

Após três dias da última sessão de acupuntura os animais foram pesados em uma balança digital com graduação de 1 em 1 grama.

Figura 19: Representação esquemática da localização dos pontos E36, B23 e VG3 no rato



Fonte: Elaboração própria.

Figura 20: Acupuntura no ponto E36



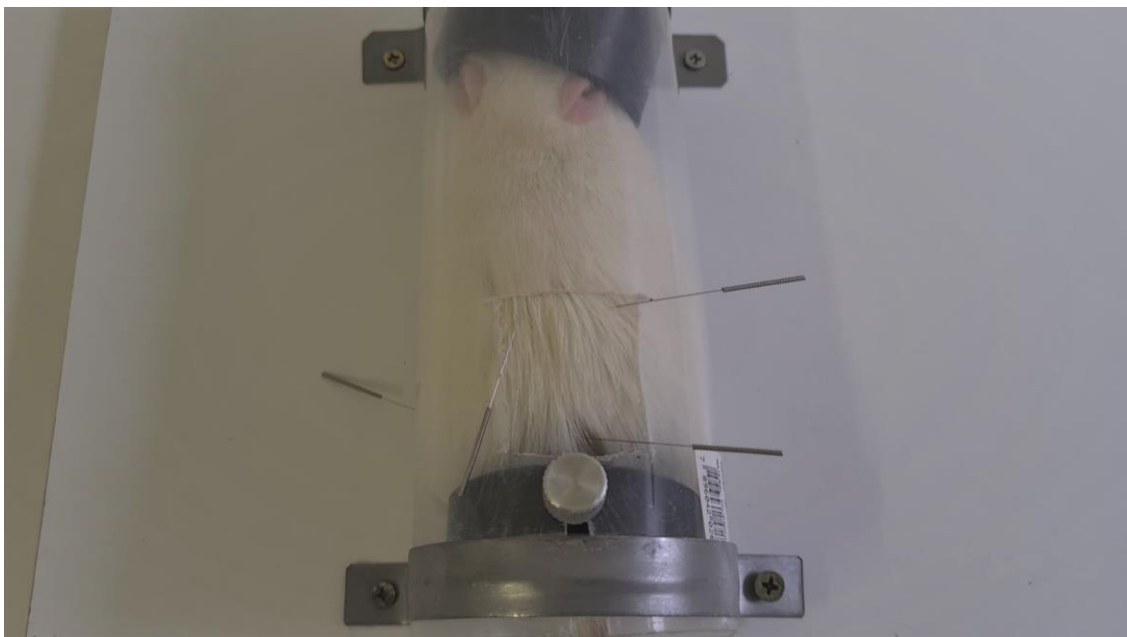
Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 21: Vista lateral do animal durante a sessão de acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Figura 22: Vista superior do animal durante a sessão de acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3.



Fonte: Registro fotográfico próprio.

Vídeo 4: Demonstração de procedimento de acupuntura experimental em rato



Link: <https://youtu.be/eLW9Z2lFiss>

Fonte: Registro próprio.

4.4.5 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados contínuos, no caso massa corporal das ratas. Após a verificação da normalidade dos dados, os resultados foram apresentados como média \pm desvio-padrão e tratados pelo teste One-Way ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, afim de averiguar a diferença entre

os grupos. Para análise da massa corporal inicial e massa corporal na vigésima semana após a cirurgia, foi utilizado teste t student. Para todas as análises realizadas as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Para realização das análises foi utilizado o software Past versão 4.05 compatível com o sistema operacional Windows.

4.5 Resultados

Foi realizado o acompanhamento da massa corporal dos animais dos quatro grupos avaliados. O dia da realização da cirurgia ou cirurgia Sham foi chamado de T0 e o dia da pesagem dos animais, 20 semanas após a realização da cirurgia ou cirurgia Sham, foi chamado de T20. Não foi demonstrada diferença na massa corporal dos animais entre os quatro grupos em T0, como demonstrado no gráfico A da figura 24.

Ao se comparar cada grupo consigo mesmo em T0 e T20, todos os grupos demonstraram aumento significativo da massa corporal em T20 em relação a T0, conforme demonstrado na tabela 5 e gráficos A, B, C, D e E da figura 23.

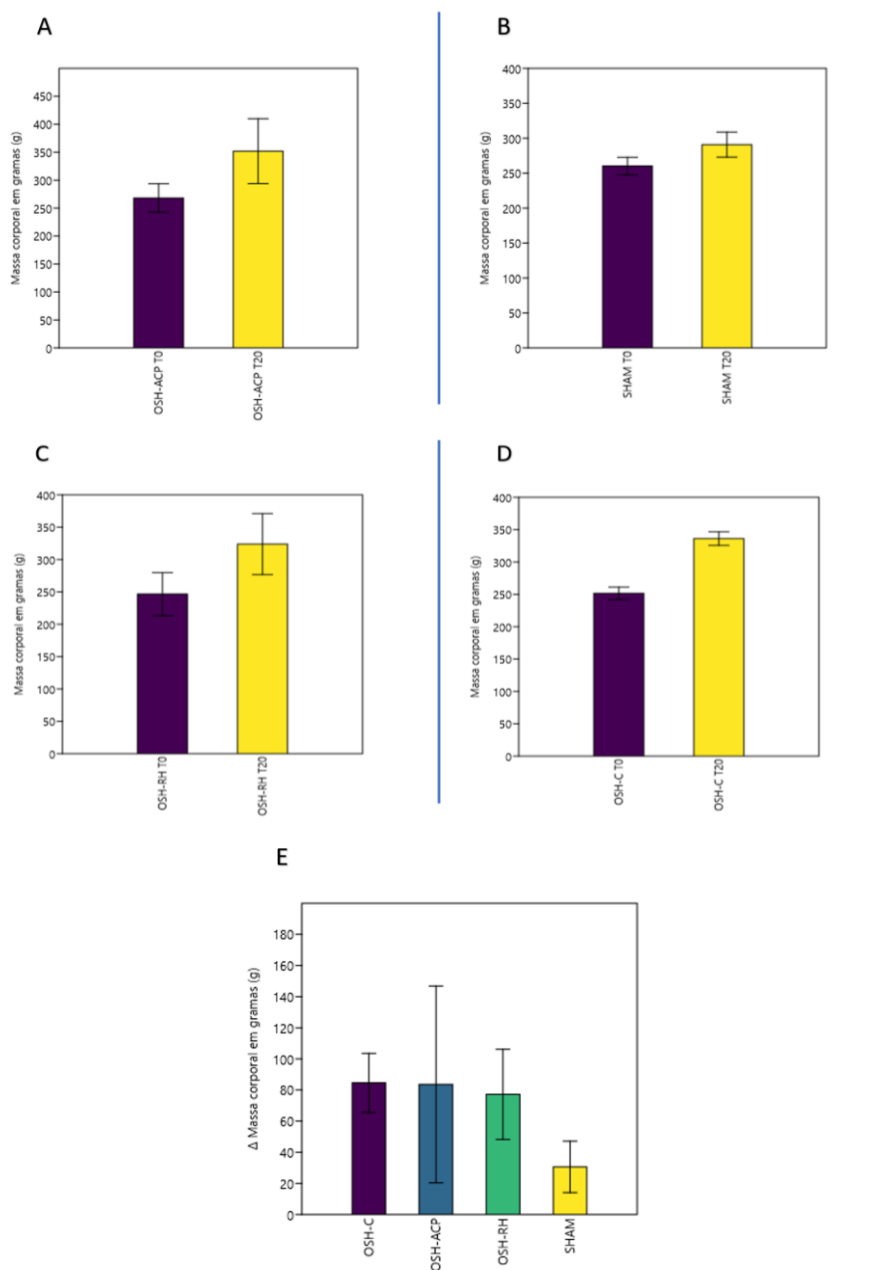
Tabela 5: Resultados da alteração da massa corporal (MC) das ratas, em gramas, avaliada nos grupos OSH-C, OSH-ACP, OSH-RH, SHAM.

Grupo	MC T0 (g)	MC T20 (g)	p-valor	Δ MC (g)
OSH-C	251,60 \pm 9,61	336,2 \pm 10,47	<0,0001*	84,6 \pm 9,68
OSH-ACP	268,20 \pm 12,99	351,8 \pm 29,63	0,0004*	83,6 \pm 32,27
OSH-RH	246,60 \pm 17,01	323,8 \pm 24,09	0,0004*	77,2 \pm 14,79
SHAM	260,20 \pm 6,42	290,8 \pm 9,12	0,0003*	30,6 \pm 8,41

MC - Massa corporal em gramas; T0:Tempo 0, data da cirurgia ou cirurgia Sham; T20:20 semanas após a data da cirurgia ou cirurgia Sham; OSH-C – Grupo dos animais operados e que não sofreram intervenção; OSH-ACP - Grupo dos animais operados e que passaram pela acupuntura; OSH-RH - Grupo dos animais operados e que receberam reposição hormonal com 50 μ g/Kg de 17 beta-estradiol via intramuscular; SHAM - Grupo dos animais falsamente operados e que não sofreram intervenção. Teste T-Student. Dados apresentados em médias \pm desvio padrão. *: p-valor <0,05.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 23: Avaliação da massa corporal



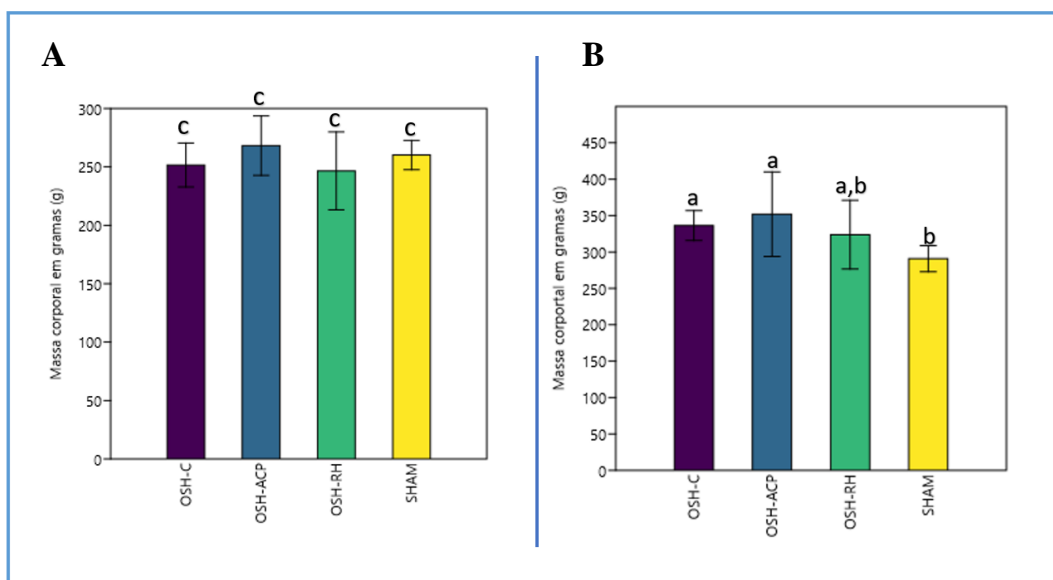
Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. T0:Tempo 0, data da cirurgia ou cirurgia Sham.

T20:20 semanas após a data da cirurgia ou cirurgia Sham. Gráfico A: OSH-ACP - Massa corporal em gramas dos animais operados e que passaram pela acupuntura. Gráfico B: SHAM - Massa corporal em gramas dos animais falsamente operados e que não sofreram intervenção. Gráfico C: OSH-RH - Massa corporal em gramas dos animais operados e que receberam reposição hormonal com 50 μ g/Kg de 17 beta-estradiol via intramuscular. Gráfico D: OSH-C - Massa corporal em gramas dos animais operados e que não sofreram intervenção. Gráficos A, B, C, D: Teste t student com $p < 0,05$. Gráfico E: Diferença da massa corporal em gramas entre T0 e T20 nos 4 grupos. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaboração própria

Ao realizar a comparação entre os diferentes grupos no T20, foi observado que a massa corporal dos animais do grupo SHAM (grupo dos animais falsamente operados e que não sofreram intervenção) foi diferente estatisticamente em relação aos animais dos grupos OSH-C (grupo dos animais operados e que não sofreram intervenção) e OSH-ACP (grupo dos animais operados e que passaram pela acupuntura), mas não demonstrou diferença dos animais OSH-RH (grupo dos animais operados e que receberam reposição hormonal tardia com 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de 17 beta-estradiol via intramuscular), conforme observado no gráfico B da figura 24.

Figura 24: Avaliação da massa corporal das ratas no dia da cirurgia e 20 semanas após a cirurgia ou cirurgia Sham



Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Gráfico A: Massa corporal dos animais no tempo 0, data da cirurgia ou cirurgia Sham. Gráfico B: Massa corporal dos animais no tempo 20, 20 semanas após a realização da cirurgia ou cirurgia Sham. OSH-C – Grupo dos animais operados e que não sofreram intervenção; OSH-ACP - Grupo dos animais operados e que passaram pela acupuntura; OSH-RH - Grupo dos animais operados e que receberam reposição hormonal com 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de 17 beta-estradiol via intramuscular; SHAM - Grupo dos animais falsamente operados e que não sofreram intervenção. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaboração própria.

4.6 Discussão

Sabe-se que o ganho de peso e a obesidade têm efeitos deletérios diversos, variando de um risco aumentado de morte prematura a várias doenças não fatais com impacto adverso na qualidade de vida. A obesidade é um importante fator de risco para diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, doença cardíaca coronária, infarto, acidente vascular cerebral e hipertensão (ORGANIZATION, 2016).

As mudanças hormonais da menopausa em mulheres não parecem ser o fator principal relacionado ao ganho de peso nessa faixa etária. O avanço da idade tem demonstrado maior relação com o ganho de peso nas mulheres do que a menopausa em si. Porém, tanto em animais quanto em humanos, a terapia com reposição de estrogênio tem demonstrado melhora na tendência ao acúmulo de gordura abdominal central. Logo, conclui-se que as alterações hormonais durante a perimenopausa contribuem substancialmente para o aumento da obesidade abdominal nas mulheres, o que leva a morbidade física e psicológica adicional (DAVIS e colab., 2012).

A remoção ovariana em ratas como modelo para indução de condições análogas à menopausa humana é muito utilizada como modelo experimental e nesse estudo a remoção conjunta dos ovários, útero e tubas uterinas se demonstrou eficaz como uma alternativa à remoção ovariana apenas. Mesmo após um longo período após a cirurgia (20 semanas), todos os animais permaneceram saudáveis, com cuidados adequados em relação a pelagem, comportamento adequado à espécie e apetite preservado.

Os animais do grupo OSH-RH, iniciaram o tratamento de reposição hormonal tardio, 10 semanas após a cirurgia de OSH, com o intuito de que os efeitos protetores do estrógeno endógeno não tivessem mais influência nesses animais (SUZUKI e colab., 2007). Mesmo com o início do tratamento tardio, esses animais tiveram um ganho de massa/peso comparável ao ganho de peso dos animais do grupo SHAM, ou seja, dos animais que permaneciam com seus ovários e, portanto, a produção estrogênica endógeno íntegra. Esse fato demonstra que para o ganho de massa corporal, a reposição mesmo que tardia de estrógeno, na dosagem de 50 µg/Kg de 17 beta-estradiol via intramuscular, aplicada duas vezes na semana, por 10 semanas, teve um efeito benéfico ao evitar um ganho de massa corporal excessivo.

Os benefícios da terapia hormonal da menopausa são claros e de acordo com a literatura é eficaz na resolução dos sintomas da menopausa como problemas

vasomotores (fogachos), alterações atróficas (dispareunia superficial e sensação de secura vaginal) e problemas urinários. Porém ainda existe um risco associado ao uso hormonal de desenvolvimento de complicações indesejáveis. Nos casos os quais haja contra-indicações para a terapia hormonal da menopausa ou se a paciente não quiser fazer uso hormonal, tratamentos alternativos e complementares para os sintomas da menopausa devem ser considerados (KUTLESIC e colab., 2016).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de propor a prática da acupuntura como um tratamento complementar para aliviar os sintomas associados à menopausa (CHIARAMONTE e colab., 2017; TAKEDA e colab., 2018; WANG e colab., 2015; XU e colab., 2005; ZHOU e colab., 2014). Em relação ao ganho de massa corporal, não foi observado um efeito significativo do início tardio da prática da acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3, aplicados 2 vezes por semana, durante 10 semanas, nos animais. Contudo o aumento da massa corporal é apenas um dos diversos sintomas relacionados à menopausa.

Em relação ao comportamento dos animais do grupo OSH-ACP, foi percebido que os animais rapidamente se tornaram bem condicionados ao uso do contensor, e entravam no dispositivo quase que espontaneamente, como pode ser visto no vídeo 3. Tal fato observacional do comportamento dos animais pode indicar que pelo menos eles não sentiam desconforto ou forte repulsa pelo tratamento com acupuntura.

Outras análises também devem ser realizadas para verificar a influência da ação da acupuntura nos animais após a remoção do estímulo ovariano, como mensuração sérica dos hormônios sexuais (estrógeno, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante) e avaliação da densidade mineral óssea são alguns exemplos.

4.6 Conclusão

Os resultados dessa pesquisa sugerem que a reposição hormonal tardia com 17 beta-estradiol na dosagem de 50 µg/Kg via intramuscular, aplicada duas vezes na semana, por 10 semanas, teve influência benéfica para evitar o ganho de peso excessivo nos animais após a ovário-salpingo-histerectomia. Conclui-se também que o tratamento com acupuntura nos pontos E36, B23 e VG3, aplicados após 10 semanas da ovário-salpingo-histerectomia, duas vezes por semana, durante 10 semanas, não teve influência no ganho de peso das ratas.

O presente estudo também conclui que a prática experimental de acupuntura em ratos é uma alternativa viável para o estudo dessa modalidade terapêutica e que os animais apresentam boa tolerância ao agulhamento e não demonstraram repulsa à prática. Logo é uma alternativa segura para os animais, ética e viável experimentalmente.

4.7 Perspectivas futuras

Em virtude da pandemia de Covid-19 causada pelo vírus Sars-Cov-2 a rotina de experimentos planejada anteriormente não pôde ser cumprida em sua totalidade. Dentre os vários transtornos oriundos da pandemia, um deles foi a restrição no deslocamento, alteração no fornecimento dos animais de experimentação pelo biotério e piora na comunicação entre os membros da equipe de pesquisa devido ao isolamento social. Em virtude disso algumas análises ainda não foram concluídas e serão aqui descritas como perspectivas futuras para sua realização.

Temos como perspectiva futura a realização de análises sorológicas de hormônios sexuais (estradiol, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante) e suas devidas análises estatísticas entre os grupos avaliados nesse trabalho e posterior publicação dos dados obtidos.

Outra perspectiva futura é a realização de análises histológicas da estrutura óssea trabecular do fêmur e vértebras lombares dos animais estudados nesse trabalho e posterior publicação dos dados obtidos.

Por fim pretendemos gerar e publicar procedimentos operacionais padrão (POP) para anestesia e analgesia em procedimentos com grau de invasividade nível III e para ovário-salpingo-histerectomia em modelo murino (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar).

REFERÊNCIAS:

- AKIMOVNA, Ekaterina e RIVERA, B. **Anestesia em animais de experimentação**. [S.l.: s.n.], [S.d.]. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 24 fev 2020.
- ALMEIDA, Maria e colab. **Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology**. *Physiological reviews*, v. 97, n. 1, p. 135–187, 2017a.
- ALMEIDA, Maria e colab. **Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology**. *Physiological Reviews*, v. 97, n. 1, p. 135–187, Jan 2017b.
- ALTMAN, Sheldon. **Small animal acupuncture: Scientific basis and clinical applications**. *Complementary and alternative veterinary medicine: Principles and practice* by Shoen, AM and Wynn, SG Mosby Publications, USA, p. 147–167, 1998.
- AVIS, Nancy E. e colab. **Duration of menopausal vasomotor symptoms over the menopause transition**. *JAMA Internal Medicine*, v. 175, n. 4, p. 531–539, 1 Abr 2015a.
- AVIS, Nancy E. e colab. **Duration of menopausal vasomotor symptoms over the menopause transition**. *JAMA Internal Medicine*, v. 175, n. 4, p. 531–539, 1 Abr 2015b.
- AVIS, Nancy E. e colab. **Is there a menopausal syndrome? Menopausal status and symptoms across racial/ethnic groups**. *Social Science and Medicine*, v. 52, n. 3, p. 345–356, 2001.
- AVIS, Nancy E. e CRAWFORD, Sybil L. e GREEN, Robin. **Vasomotor Symptoms Across the Menopause Transition: Differences Among Women**. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. [S.l.]: W.B. Saunders. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30401547>>. Acesso em: 22 abr 2020. , 1 Dez 2018
- BABER, R. J. e PANAY, N. e FENTON, A. **2016 IMS Recommendations on womens midlife health and menopause hormone therapy**. *Climacteric*, v. 19, n. 2, p. 109–150, 3 Mar 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26872610/>>. Acesso em: 10 dez 2020.
- BACCARO, Luiz Francisco e colab. **The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil**. *Clinical interventions in aging*, v. 10, p. 583–91, 2015.
- BACON, Janice L. **The Menopausal Transition**. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. [S.l.]: W.B. Saunders. , 1 Jun 2017
- BAGNOLI, Vicente Renato e colab. **Metabolic disorder and obesity in 5027 Brazilian postmenopausal women**. *Gynecological Endocrinology*, v. 30, n. 10, p. 717–720, 22 Set 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09513590.2014.925869>>. Acesso em: 13 dez 2020.
- Base Legislação da Presidência da República - Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008**. Disponível em: <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=11794&ano=2008&ato=57aQzYE5UNRpWT7e7>>. Acesso em: 3 fev 2021.
- BATISTA, Carlos Augusto Marques e COLLEONI NETO, Ramiro e LOPES FILHO, Gaspar de Jesus. **Comparative study of the healing process of the aponeurosis of the anterior abdominal wall of rats after wound closure using 3-0 nylon suture and N-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive**. *Acta Cirúrgica Brasileira*. [S.l.]: scielo. , 2008
- BAZZIGALUPPI, Paolo e colab. **Oophorectomy Reduces Estradiol Levels and**

Long-Term Spontaneous Neurovascular Recovery in a Female Rat Model of Focal Ischemic Stroke. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 11, p. 338, 2018.

BITZER, J. **Overview of perimenopausal contraception.** *Climacteric*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30562124>>. Acesso em: 22 abr 2020. , 2 Jan 2019

BLOCK, Erik. **Quantitative morphological investigations of the follicular system in women.** *Cells Tissues Organs*, v. 14, n. 1–2, p. 108–123, 1952. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14932631/>>. Acesso em: 14 dez 2020.

BRANDAO, Cristina Mariano Ruas e colab. **Gastos públicos com medicamentos para o tratamento da osteoporose na pos-menopausa.** *Revista de Saúde Pública*, v. 47, n. 2, p. 390–402, Jun 2013.

BROWN, Christopher A e STARR, Aijing Z e NUNLEY, James A. **Analysis of Past Secular Trends of Hip Fractures and Predicted Number in the Future 2010–2050.** *Journal of Orthopaedic Trauma*, v. 26, n. 2, p. 117–122, Fev 2012.

BRUYNEEL, Marie. **Sleep disturbances in menopausal women: Aetiology and practical aspects.** *Maturitas*, v. 81, n. 3, p. 406–409, 1 Jul 2015. Disponível em: <<http://www.maturitas.org/article/S0378512215006714/fulltext>>. Acesso em: 10 dez 2020.

CARTER, Christy S e colab. **Bring Back the Rat!** *The Journals of Gerontology: Series A*, v. 75, n. 3, p. 405–415, 14 Fev 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/75/3/405/5693359>>. Acesso em: 3 fev 2021.

CAVALLINI, Aldo e colab. **Estrogen receptor (ER) and ER-related receptor expression in normal and atrophic human vagina.** *Maturitas*, v. 59, n. 3, p. 219–225, 20 Mar 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18328649/>>. Acesso em: 7 dez 2020.

CHANG, R. J. e JUDD, H. L. **The ovary after menopause.** *Clinical Obstetrics and Gynecology*. [S.l.]: Clin Obstet Gynecol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6452241/>>. Acesso em: 15 dez 2020. , 1981

CHENG, Kwokming James. **Neurobiological Mechanisms of Acupuncture for Some Common Illnesses: A Clinician's Perspective.** *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, v. 7, n. 3, p. 105–114, Jun 2014.

CHEUNG, Lily. e LI, Peng e WONG, Cheng. **The mechanism of acupuncture therapy and clinical case studies.** [S.l.]: Taylor & Francis, 2001.

CHIARAMONTE, Delia e RING, Melinda e LOCKE, Amy B. **Integrative Women's Health.** *Medical Clinics of North America*. [S.l.]: W.B. Saunders. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28802473/>>. Acesso em: 19 fev 2021. , 1 Set 2017

CHRISTRUP, L. L. **Morphine metabolites.** 1997, [S.l.]: Blackwell Munksgaard, 1997. p. 116–122. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9061094/>>. Acesso em: 4 fev 2021.

CLARK, Nathaniel G. e FOX, Kathleen M. e GRANDY, Susan. **Symptoms of diabetes and their association with the risk and presence of diabetes: Findings from the study to help improve early evaluation and management of risk factors leading to diabetes (SHIELD).** *Diabetes Care*, v. 30, n. 11, p. 2868–2873, 1 Nov 2007. Disponível em: <www.diabetes.org>. Acesso em: 13 dez 2020.

CLARK, Terrence P. **The Clinical Pharmacology of Cyclooxygenase-2-Selective and Dual Inhibitors.** *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. [S.l.]: Vet Clin North Am Small Anim Pract. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16984827/>>. Acesso em: 4 fev 2021. , Set 2006

- COLMAN, Eric G. The Food and Drug Administration's Osteoporosis Guidance Document: Past, Present, and Future. 1 Jun 2003, [S.l.]: J Bone Miner Res, 1 Jun 2003. p. 1125–1128. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12817768/>>. Acesso em: 10 fev 2021.
- CRAY, Lori A. e colab. **Symptom clusters during the late reproductive stage through the early postmenopause: Observations from the Seattle Midlife Women's Health Study.** Menopause, v. 19, n. 8, p. 864–869, Ago 2012.
- CURTIS, Kathryn M. e colab. **U.S. selected practice recommendations for contraceptive use, 2016.** MMWR Recommendations and Reports, v. 65, n. 4, p. 1–66, 2016.
- DANFORD, Christopher J. e TRIVEDI, Hirsh D. e BONDER, Alan. **Bone Health in Patients With Liver Diseases.** Journal of Clinical Densitometry, Jan 2019.
- DAVIDSON, M K e LINDSEY, J R e DAVIS, J K. **Requirements and selection of an animal model.** Israel journal of medical sciences, v. 23, n. 6, p. 551–555, Jun 1987.
- DAVIS, S. R. e colab. **Understanding weight gain at menopause.** Climacteric. [S.l.]: Climacteric. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22978257/>>. Acesso em: 19 fev 2021. , Out 2012
- DAWSON-HUGHES, Bess. **A Revised Clinician's Guide to the Prevention and Treatment of Osteoporosis.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 93, n. 7, p. 2463–2465, Jul 2008.
- DENERIS, Angela. **PALM-COEIN Nomenclature for Abnormal Uterine Bleeding.** Journal of Midwifery & Women's Health, v. 61, n. 3, p. 376–379, 1 Maio 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jmwh.12440>>. Acesso em: 9 abr 2020.
- DOMINICK, Sally e colab. **Levonorgestrel intrauterine system for endometrial protection in women with breast cancer on adjuvant tamoxifen.** Cochrane Database of Systematic Reviews. [S.l.]: John Wiley and Sons Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26649916>>. Acesso em: 22 abr 2020. 9 Dez 2015
- DOUGLAS, B L. **A Re-evaluation of Guedel's Stages of Anesthesia: With particular reference to the ambulatory dental general anesthetic patient.** Journal of the American Dental Society of Anesthesiology, v. 5, n. 1, p. 11–4, Jan 1958. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19598725>>. Acesso em: 4 fev 2021.
- DRAKE, Matthew T. e CLARKE, Bart L. e LEWIECKI, E. Michael. **The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis.** Clinical Therapeutics, v. 37, n. 8, p. 1837–1850, Ago 2015.
- EBBIARY, N. A. Ahmed e LENTON, E. A. e COOKE, I. D. **Hypothalamic-pituitary ageing: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women.** Clinical Endocrinology, v. 41, n. 2, p. 199–206, 1 Ago 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.1994.tb02530.x>>. Acesso em: 14 dez 2020.
- ECKLEY, Samantha S. e colab. **Acepromazine and Chlorpromazine as Pharmaceutical-grade Alternatives to Chlorprothixene for Pupillary Light Reflex Imaging in Mice.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS, v. 59, n. 2, p. 197–203, 1 Mar 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32073400/>>. Acesso em: 4 fev 2021.
- EGERBACHER, M. **Anatomische und hitologische Untersuchungen zur Morphologic ausgewahlter Akupunkturpunkte bei Rind und Hund.** [S.l.]: Doctoral Dissertation. Vienna, Vienna Vet Med University. , 1971

- ERNST, Edzard. **Acupunctura uma Avaliacao Cientifica**. [S.l.]: Editora Manole Ltda, 2001.
- FADDY, M. J. e colab. **Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause**. *Human Reproduction*, v. 7, n. 10, p. 1342–1346, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1291557/>>. Acesso em: 14 dez 2020.
- FAUBION, Stephanie S. e SHUSTER, Lynne T. e BHARUCHA, Adil E. **Recognition and management of nonrelaxing pelvic floor dysfunction**. *Mayo Clinic Proceedings*. [S.l.]: Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22305030/>>. Acesso em: 10 dez 2020. , 2012
- FAUBION, Stephanie S. e SOOD, Richa e KAPOOR, Ekta. **Genitourinary Syndrome of Menopause: Management Strategies for the Clinician**. *Mayo Clinic Proceedings*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 Dez 2017
- FREEDMAN, Robert R. **Menopausal hot flashes: Mechanisms, endocrinology, treatment**. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2014
- FREEMAN, Ellen W. e SAMMEL, Mary D. e SANDERS, Richard J. **Risk of long-term hot flashes after natural menopause: Evidence from the Penn Ovarian Aging Study cohort**. *Menopause*, v. 21, n. 9, p. 924–932, 2014.
- GAKSCH, Martin e colab. **Vitamin D and mortality: Individual participant data meta-analysis of standardized 25-hydroxyvitamin D in 26916 individuals from a European consortium**. *PloS one*, v. 12, n. 2, p. e0170791, 2017.
- GÁL, P e colab. **Simple interrupted percutaneous suture versus intradermal running suture for wound tensile strength measurement in rats: a technical note**. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, v. 43, n. 1, p. 61–65, 2009.
- GALLAGHER, J Christopher e colab. **Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis**. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 142, p. 155–170, 2014.
- GANDHI, Jason e colab. **Genitourinary syndrome of menopause: an overview of clinical manifestations, pathophysiology, etiology, evaluation, and management**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. [S.l.]: Mosby Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27472999/>>. Acesso em: 7 dez 2020. , 1 Dez 2016
- GASS, Margery e REBAR, Robert W. **The Menopause**. *The Global Library of Women's Medicine*, 2009. Disponível em: <http://www.glowm.com/index.html?p=glowm.cml/section_view&articleid=79>. Acesso em: 14 dez 2020.
- GEBHART, John B. e colab. **Expression of estrogen receptor isoforms α and β messenger RNA in vaginal tissue of premenopausal and postmenopausal women**. 2001, [S.l.]: Mosby Inc., 2001. p. 1325–1331. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11744904/>>. Acesso em: 7 dez 2020.
- GENTRY-MAHARAJ, Aleksandra e colab. **Use and perceived efficacy of complementary and alternative medicines after discontinuation of hormone therapy: A nested United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening cohort study**. *Menopause*, v. 22, n. 4, p. 384–390, 9 Abr 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290539>>. Acesso em: 13 maio 2020.
- GIBBS, Robert B. e AGGARWAL, Payal. **Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: Implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline**. *Hormones and Behavior*, v. 34, n. 2, p. 98–111, 1 Out 1998.
- GOLD, Ellen B e colab. **Lifestyle and Demographic Factors in Relation to**

Vasomotor Symptoms: Baseline Results from the Study of Women's Health Across the Nation. American Journal of Epidemiology Hopkins Bloomberg School of Public Health All rights reserved, v. 159, n. 12, p. 1189–1199, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aje/article-abstract/159/12/1189/86100>>. Acesso em: 13 maio 2020.

GOLDBERG, Alan. **The principles of humane experimental technique: Is it relevant today?** ALTEX, v. 27, n. 2, p. 149–151, 1 Maio 2010. Disponível em: <<http://www.cochrane.org.>>. Acesso em: 4 fev 2021.

GOLDSTEIN, Irwin. **Recognizing and treating urogenital atrophy in postmenopausal women.** Journal of Women's Health. [S.l.]: J Womens Health (Larchmt). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20156082/>>. Acesso em: 7 dez 2020. , 1 Mar 2010

GORSKY, Kevin. **An Evolution of Suffering: Anesthesiology's Contribution to Pain Management.** Journal of Anesthesia History. [S.l.]: Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.anesthesiahistoryjournal.org/article/S2352452918300719/fulltext>>. Acesso em: 3 fev 2021. , 1 Dez 2019

GOULETSOU, Pagona G e colab. **Comparison of continuous intradermal with simple interrupted suture pattern: an experimental study in dogs.** Topics in companion animal medicine, v. 41, p. 100454, Nov 2020.

GRACIA, Clarisa R. e FREEMAN, Ellen W. **Onset of the Menopause Transition: The Earliest Signs and Symptoms.** Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. [S.l.]: W.B. Saunders. , 1 Dez 2018

GREENDALE, Gail A e colab. **Bone mineral density loss in relation to the final menstrual period in a multiethnic cohort: Results from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN).** Journal of Bone and Mineral Research, v. 27, n. 1, p. 111–118, Jan 2012.

GREENE, J. G. **A factor analytic study of climacteric symptoms.** Journal of Psychosomatic Research, v. 20, n. 5, p. 425–430, 1 Jan 1976.

GREENFIELD, Edward A. **Administering anesthesia to mice, rats, and hamsters.** Cold Spring Harbor Protocols, v. 2019, n. 6, p. 457–459, 1 Jun 2019.

GROSSMAN, David C. e colab. **Interventions to Prevent Falls in Community-Dwelling Older Adults.** JAMA, v. 319, n. 16, p. 1696, Abr 2018.

Guia anestesia e analgesia em animais de laboratório. . [S.l: s.n.], [S.d.].

GUO, Taipin e colab. **Acupuncture for osteoporosis: a systematic review protocol.** Systematic reviews, v. 5, n. 1, p. 161, 2016.

HARLOW, Siobán D. e colab. **Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: Addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging.** Fertility and Sterility, v. 97, n. 4, p. 843–851, 2012.

HARLOW, Siobán D. e colab. **It is not just menopause: symptom clustering in the Study of Women's Health Across the Nation.** Women's Midlife Health, v. 3, n. 1, Dez 2017.

HARLOW, Siobán D. e colab. **The ReSTAGE Collaboration: defining optimal bleeding criteria for onset of early menopausal transition.** Fertility and Sterility, v. 89, n. 1, p. 129–140, Jan 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111111/>>. Acesso em: 15 dez 2020.

HOWE, Tracey E e colab. **Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women.** Cochrane Database of Systematic Reviews, n. 7, Jul 2011.

JACKSON, Rebecca e MYSIW, W. **Insights into the Epidemiology of Postmenopausal Osteoporosis: The Women's Health Initiative.** Seminars in

Reproductive Medicine, v. 32, n. 06, p. 454–462, Out 2014.

JOHANNES DE VILLIERS, Tobias. **Bone health and osteoporosis in postmenopausal women.** Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology. [S.l.]: Baillière Tindall. , 1 Fev 2009

KALU, Dike N. **The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.** Bone and Mineral. [S.l.]: Elsevier. , 1 Dez 1991a

KALU, Dike N. **The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.** Bone and Mineral, v. 15, n. 3, p. 175–191, 1 Dez 1991b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016960099190124I>>. Acesso em: 8 fev 2021.

KANIS, J A. **Assessment of osteoporosis at the primary health care level. WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases.** WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, 2007.

KANIS, J A e colab. **European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women.** Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, v. 24, n. 1, p. 23–57, Jan 2013.

KANIS, J A e colab. **Identification and management of patients at increased risk of osteoporotic fracture: outcomes of an ESCEO expert consensus meeting.** Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, v. 28, n. 7, p. 2023–2034, 2017.

KAPTCHUK, Ted J. **Acupuncture: theory, efficacy, and practice.** Annals of internal medicine, v. 136, n. 5, p. 374–383, 2002.

KARSDAL, M. A. e colab. **The pathogenesis of osteoarthritis involves bone, cartilage and synovial inflammation: May estrogen be a magic bullet?** Menopause International. [S.l.]: Menopause Int. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23024184/>>. Acesso em: 14 dez 2020. , Dez 2012

KAUNITZ, Andrew M. e INKI, Pirjo. **The levonorgestrel-releasing intrauterine system in heavy menstrual bleeding: A benefit-risk review.** Drugs. [S.l.]: Springer. , 12 Dez 2012

KEYS, THOMAS E. **HISTORICAL VIGNETTES.** Anesthesia & Analgesia, v. 54, n. 4, p. 442–443, Jul 1975. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1096680/>>. Acesso em: 4 fev 2021.

KHAJURIA, Deepak Kumar e RAZDAN, Rema e MAHAPATRA, D Roy. **Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas.** Revista Brasileira de Reumatologia, v. 52, n. 3, p. 466–470, Jun 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042012000300016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 fev 2021.

KHARODE, Yogendra P. e SHARP, Michael C. e BODINE, Peter V.N. **Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery.** Methods in Molecular Biology, v. 455, p. 111–124, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-104-8_8>. Acesso em: 30 jan 2021.

KIRK, Robert G.W. **Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research.** Science Technology and Human Values, v. 43, n. 4, p. 622–648, 1 Jul 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3027778/>>. Acesso em: 3 fev 2021.

KLEIN-NULEND, Jenneke e colab. **Bone cell mechanosensitivity, estrogen**

- deficiency, and osteoporosis.** *Journal of Biomechanics*, v. 48, n. 5, 2015.
- KOMORI, Toshihisa. **Animal models for osteoporosis.** *European Journal of Pharmacology*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 15 Jul 2015
- KORICANAC, G. e colab. **Insulin signaling in the liver and uterus of ovariectomized rats treated with estradiol.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 108, n. 1–2, p. 109–116, Jan 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17931855/>>. Acesso em: 10 fev 2021.
- KUIPER, George G.J.M. e colab. **Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors and α and β .** *Endocrinology*, v. 138, n. 3, p. 863–870, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9048584/>>. Acesso em: 10 dez 2020.
- KUTLESIC, Ranko M e colab. **ALTERNATIVES OF MENOPAUSAL HORMONE THERAPY.** *Medicinski pregljed*, v. 69, n. 5–6, p. 177–182, Out 2016.
- LAGARI, Violet e GAVCOVICH, Tara e LEVIS, Silvina. **The Good and the Bad About the 2017 American College of Physicians Osteoporosis Guidelines.** *Clinical Therapeutics*, v. 40, n. 1, p. 168–176, Jan 2018.
- LAMBERT, M. e BEGON, E. e HOCKÉ, C. **Contraception for women after 40: CNGOF Contraception Guidelines.** *Gynecologie Obstetrique Fertilité et Senologie*, v. 46, n. 12, p. 865–872, 1 Dez 2018.
- LANGEVIN, Helene M. e YANDOW, Jason A. **Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes.** *The Anatomical Record*, v. 269, n. 6, p. 257–265, Dez 2002.
- LASOTA, A e DANOWSKA-KLONOWSKA, D. **Experimental osteoporosis--different methods of ovariectomy in female white rats.** *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, v. 49 Suppl 1, p. 129–131, 2004.
- LORD, C. e SEKEROVIC, Z. e CARRIER, J. **Sleep regulation and sex hormones exposure in men and women across adulthood.** *Pathologie Biologie*. [S.l.]: Elsevier Masson SAS. , 1 Out 2014
- LORENTZON, Mattias. **Treating osteoporosis to prevent fractures: current concepts and future developments.** *Journal of Internal Medicine*, Jan 2019.
- LUINE, Victoria N. **Estradiol and cognitive function: Past, present and future.** *Hormones and Behavior*. [S.l.]: Academic Press Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25205317/>>. Acesso em: 10 dez 2020. , 1 Set 2014
- MACIOCIA, Giovanni e MING, Su xin. **Os fundamentos da medicina chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fitoterapeutas.** 1996.
- Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of the North American Menopause Society.** *Menopause*, v. 20, n. 9, p. 888–902, Set 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23985562/>>. Acesso em: 7 dez 2020.
- MANOLAGAS, Stavros C e O'BRIEN, Charles A e ALMEIDA, Maria. **The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease.** *Nature reviews. Endocrinology*, v. 9, n. 12, p. 699–712, Dez 2013.
- MATTHEWS, Karen A. e colab. **Are Changes in Cardiovascular Disease Risk Factors in Midlife Women Due to Chronological Aging or to the Menopausal Transition?** *Journal of the American College of Cardiology*, v. 54, n. 25, p. 2366–2373, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128666/>>. Acesso em: 13 dez 2020.
- MCLENDON, Amber N e WOODIS, C Brock. **A Review of Osteoporosis Management in Younger Premenopausal Women.** *Women's Health*, v. 10, n. 1, p. 59–77, Jan 2014.

MENDES, Karina Giane e colab. **Prevalência de síndrome metabólica e seus componentes na transição menopáusicas: Uma revisão sistemática.** Cadernos de Saúde Pública. [S.l.]: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2012000800002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 13 dez 2020. , Ago 2012

Ministério da Saúde Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares PMNPC Resumo executivo Brasília, fevereiro de 2005. . [S.l: s.n.], [S.d.].

NAKAMURA, Takahiro J. e colab. **Estrogen directly modulates circadian rhythms of PER2 expression in the uterus.** American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, v. 295, n. 5, Nov 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18728223/>>. Acesso em: 10 fev 2021.

NELSON, Anita L. **Levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS 12) for prevention of pregnancy for up to five years.** Expert Review of Clinical Pharmacology, v. 10, n. 8, p. 833–842, 3 Ago 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617060>>. Acesso em: 22 abr 2020.

NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, Diagnosis, and Therapy. **Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy.** JAMA: The Journal of the American Medical Association, v. 285, n. 6, p. 785–795, Fev 2001.

NORMAS MANUAIS TÉCNICOS SÉRIE DIREITOS SEXUAIS DIREITOS REPRODUTIVOS -CADERNO, Série A. **Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas Brasília-DF 2008 Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa.** [S.l: s.n.], 2008. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/editora>>. Acesso em: 15 abr 2020.

OLSON, R. **The Effects of Acupuncture on Bone Mass Density and the Biochemical Mechanisms Behind It: A Research Synthesis.** n. March, 2014.

OMS, Organización Mundial de la Salud -. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 - 2005.** 2005. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf>. Acesso em: 16 fev 2021.

ORGANIZATION, World Health. **World Health Organization obesity and overweight fact sheet.** . [S.l: s.n.], , 2016

Overview | Menopause: diagnosis and management | Guidance | NICE. [S.d.].

PACIUC, John. Hormone therapy in menopause. Advances in Experimental Medicine and Biology. [S.l.]: Springer, 2020. v. 1242. p. 89–120. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32406030/>>. Acesso em: 17 fev 2021.

PARHIZKAR, S e IBRAHIM, R e LATIFF, L. Incision Choice in Laparotomy: a Comparison of Two Incision Techniques in Ovariectomy of Rats. 2008, [S.l: s.n.], 2008.

PARISH, Sharon J. e colab. **Impact of vulvovaginal health on postmenopausal women: A review of surveys on symptoms of vulvovaginal atrophy.** International Journal of Women's Health. [S.l.]: Dove Press. Disponível em: <</pmc/articles/PMC3735281/?report=abstract>>. Acesso em: 3 dez 2020. , 2013

PEI, Lin Lin e colab. **Synthesis, characterization, and pharmacodynamics study of enrofloxacin mesylate.** Drug Design, Development and Therapy, v. 14, p. 715–730, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32158191/>>. Acesso em: 4 fev 2021.

PETERLIK, M. e CROSS, H. S. **Vitamin D and calcium insufficiency-related**

chronic diseases: Molecular and cellular pathophysiology. European Journal of Clinical Nutrition. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <www.nature.com/ejcn>. Acesso em: 13 dez 2020. , 26 Dez 2009

PINKERTON, Jo Ann V. e colab. **The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society.** Menopause, v. 24, n. 7, p. 728–753, 1 Jul 2017. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00042192-201707000-00005>>. Acesso em: 15 abr 2020.

POLITI, Mary C. e SCHLEINITZ, Mark D. e COL, Nananda F. **Revisiting the duration of vasomotor symptoms of menopause: A meta-analysis.** Journal of General Internal Medicine. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18521690>>. Acesso em: 13 maio 2020. , Set 2008

POTTER, Beth e colab. **Menopause.** Primary Care - Clinics in Office Practice. [S.l.]: W.B. Saunders. , 1 Dez 2018

PRACTITIONERS, The Royal Australian College of General. **RACGP - Perimenopausal contraception: A practice-based approach.** [S.d.].

QIU, Ke e colab. **The Status of the Quality Control in Acupuncture-Neuroimaging Studies.** Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, v. 2016, p. 3685785, 2016.

QUIROZ-GONZÁLEZ, Salvador e colab. **Acupuncture Points and Their Relationship with Multireceptive Fields of Neurons.** Journal of Acupuncture and Meridian Studies, v. 10, n. 2, p. 81–89, Abr 2017.

RAHN, David D. e colab. **Systematic review highlights difficulty interpreting diverse clinical outcomes in abnormal uterine bleeding trials.** Journal of Clinical Epidemiology, v. 64, n. 3, p. 293–300, 1 Mar 2011.

RANDOLPH, John F. e colab. **The relationship of longitudinal change in reproductive hormones and vasomotor symptoms during the menopausal transition.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 90, n. 11, p. 6106–6112, Nov 2005.

RAWAL, Narinder. **Current issues in postoperative pain management.** European Journal of Anaesthesiology. [S.l.]: Lippincott Williams and Wilkins. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26509324/>>. Acesso em: 5 fev 2021. , 1 Mar 2016

RESOLUÇÃO Nº 47, DE 1º DE OUTUBRO DE 2020 - RESOLUÇÃO Nº 47, DE 1º DE OUTUBRO DE 2020 - DOU - Imprensa Nacional. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-47-de-1-de-outubro-de-2020-281069421>>. Acesso em: 31 jan 2021.

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 39, DE 20 DE JUNHO DE 2018 - Imprensa Nacional. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/27128118/do1-2018-06-25-resolucao-normativa-n-39-de-20-de-junho-de-2018-27128107>. Acesso em: 30 jan 2021.

RICHARDSON, Claire A. e FLECKNELL, Paul A. **Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: Are we making progress?** ATLA Alternatives to Laboratory Animals. [S.l.]: FRAME. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290503300207>>. Acesso em: 4 fev 2021. , 9 Abr 2005

RICHARDSON, Sandra J. e SENIKAS, Vyta e NELSON, James F. **Follicular depletion during the menopausal transition: Evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 65, n. 6, p. 1231–1237, 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3119654/>>.

Acesso em: 14 dez 2020.

RITSCHL, Lucas M. e colab. **Ketamine-xylazine anesthesia in rats: Intraperitoneal versus intravenous administration using a microsurgical femoral vein access.**

Journal of Reconstructive Microsurgery, v. 31, n. 5, p. 343–347, 19 Fev 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25702886/>>. Acesso em: 4 fev 2021.

RIZZOLI, René. **Postmenopausal osteoporosis: Assessment and management.** Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 32, n. 5, p. 739–757, Out 2018.

RODRIGUES, Brenda Diniz e colab. **Analgesia e anestesia em modelos experimentais.** R. Soc. bras. Ci. Anim. Lab., p. 107–115, 2017. Disponível em: <http://www.sbcal.org.br/download/download?ID_DOWNLOAD=83>. Acesso em: 4 fev 2021.

ROSS, A Catharine e colab. **D R I DIETARY REFERENCE INTAKES Calcium Vitamin D Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium Food and Nutrition Board.** [S.l.: s.n.], 2011.

ROSS, Jeremy. **Combinações dos Pontos de Acupuntura: A chave para o êxito clínico.** 12–2002. ed. [S.l.: s.n.], 2002.

RUSSELL, WMS e BURCH, RL. **The principles of humane experimental technique.** 1959. Disponível em:

<[http://117.239.25.194:7000/jspui/bitstream/123456789/1342/1/PRILIMINARY AND CONTENTS.pdf](http://117.239.25.194:7000/jspui/bitstream/123456789/1342/1/PRILIMINARY_AND_CONTENTS.pdf)>. Acesso em: 25 fev 2020.

SANTORO, Nanette e colab. **Helping midlife women predict the onset of the final menses: SWAN, the Study of Women’s Health Across the Nation.** Menopause, v. 14, n. 3, p. 415–424, Maio 2007. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00042192-200714030-00017>>. Acesso em: 9 abr 2020.

SANTORO, Nanette e colab. **Impaired Folliculogenesis and Ovulation in Older Reproductive Aged Women.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 88, n. 11, p. 5502–5509, 1 Nov 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-021839>>. Acesso em: 14 dez 2020.

SANTORO, Nanette e RANDOLPH, John F. **Reproductive Hormones and the Menopause Transition.** Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. [S.l.]: NIH Public Access. Disponível em: </pmc/articles/PMC3197715/?report=abstract>. Acesso em: 14 dez 2020. , Set 2011

SAYEM, Abu Sadat Md e colab. **Differential expression of the receptors for thyroid hormone, thyroid stimulating hormone, vitamin D and retinoic acid and extracellular signal-regulated kinase in uterus of rats under influence of sex-steroids.** Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 100, p. 132–141, 1 Abr 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428660/>>. Acesso em: 10 fev 2021.

SCHANAIDER, Alberto e SILVA, Paulo Cesar. **Uso de animais em cirurgia experimental.** Acta Cirurgica Brasileira, v. 19, n. 4, p. 441–447, Ago 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502004000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 fev 2021.

SHERWIN, Barbara B. e MCGILL, James. **Estrogen and cognitive functioning in women.** Endocrine Reviews. [S.l.]: Endocr Rev. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12700177/>>. Acesso em: 10 dez 2020. , 1 Abr 2003

SHIFREN, Jan L. **Genitourinary Syndrome of Menopause.** Clinical Obstetrics and Gynecology, v. 61, n. 3, p. 508–516, 1 Set 2018. Disponível em:

- <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787390/>>. Acesso em: 7 dez 2020.
- SIDDIQUI, Bilal A. e KIM, Peggy Y. **Anesthesia Stages**. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491528>>. Acesso em: 4 fev 2021.
- SIEVERT, Lynnette Leidy. **Subjective and objective measures of hot flashes**. American Journal of Human Biology, v. 25, n. 5, p. 573–580, Set 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897855>>. Acesso em: 13 maio 2020.
- SIQUEIRA, Fernando Vinholes e FACCHINI, Luiz Augusto e HALLAL, Pedro Curi. **The burden of fractures in Brazil: a population-based study**. Bone, v. 37, n. 2, p. 261–266, 2005.
- SMITH, Robert A. e colab. **Cancer screening in the United States, 2014: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 64, n. 1, p. 30–51, 1 Jan 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21212>>. Acesso em: 9 abr 2020.
- SNEDDON, Lynne U. **Pain in laboratory animals: A possible confounding factor?** ATLA Alternatives to Laboratory Animals. [S.l.]: FRAME. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119291704500309>>. Acesso em: 5 fev 2021. , 1 Jul 2017
- SÖZEN, Tümay e ÖZİŞİK, Lale e BAŞARAN, Nursel Çalık. **An overview and management of osteoporosis**. European journal of rheumatology, v. 4, n. 1, p. 46–56, Mar 2017.
- STACHOWIAK, Grzegorz e PERTYŃSKI, Tomasz e PERTYŃSKA-MARCZEWSKA, Magdalena. **Metabolic disorders in menopause**. Przegląd Menopauzalny. [S.l.]: Termedia Publishing House Ltd. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4440199/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4440199/?report=abstract)>. Acesso em: 13 dez 2020. , 2015
- STURDEE, D. W. e colab. **The menopausal hot flush: a review**. Climacteric. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 4 Jul 2017
- SUZUKI, Shotaro e colab. **Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 14, p. 6013–6018, 3 Abr 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17389368/>>. Acesso em: 17 fev 2021.
- TAKEDA, A. e colab. **Effect of acupuncture at acupoint of Shenshu (BL 23) on the bones of ovariectomized rats**. Journal of Traditional Chinese Medicine, v. 38, n. 1, p. 1–6, 2018.
- TELLA, Sri Harsha e GALLAGHER, J. Christopher. **Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis**. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 142, p. 155–170, Jul 2014.
- THURSTON, Rebecca C. e colab. **Beyond frequency: Who is most bothered by vasomotor symptoms?** Menopause, v. 15, n. 5, p. 841–847, Set 2008.
- TIAN, Limin e colab. **Prevalence of osteoporosis and related lifestyle and metabolic factors of postmenopausal women and elderly men**. Medicine (United States), v. 96, n. 43, 1 Out 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5671832/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC5671832/?report=abstract)>. Acesso em: 1 fev 2021.
- TOGNINI, João Ricardo F e colab. **Estudo comparativo entre a sutura contínua e a com pontos separados na parede abdominal de ratos** . Acta Cirúrgica Brasileira . [S.l.]: scielo . , 1997
- TOGNINI, João Ricardo F e GOLDENBERG, Saul. **Síntese da parede abdominal: sutura contínua ou com pontos separados? Revisão da literatura** . Acta Cirúrgica

- Brasileira . [S.l.]: scielo . , 1998
- TU, Kristie N e colab. **Osteoporosis : A Review of Treatment Options**. P & T, v. 43, n. 2, 2018.
- TURNER, A. Simon. **Animal models of osteoporosis - Necessity and limitations**. European Cells and Materials. [S.l.]: AO Research Institute Davos. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14562261/>>. Acesso em: 10 fev 2021. , 2001
- TURNER, Patricia V. e colab. **Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider**. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. [S.l.]: American Association for Laboratory Animal Science. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770320/>>. Acesso em: 4 fev 2021. , Set 2011
- WAKI, Hironori e TONONZOZ, Peter. **Endocrine Functions of Adipose Tissue**. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 2, n. 1, p. 31–56, 23 Feb 2007. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091859>>. Acesso em: 13 dez 2020.
- WANG, Hong-Du e colab. **Effects of electroacupuncture at GB points on markers of osteoporosis and bodyweight in ovariectomised rats**. Acupuncture in medicine : journal of the British Medical Acupuncture Society, v. 33, n. 6, p. 465–71, Dez 2015.
- WEBER, Miriam T. e MAKI, Pauline M. e MCDERMOTT, Michael P. **Cognition and mood in perimenopause: A systematic review and meta-analysis**. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. [S.l.]: Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770320/>>. Acesso em: 10 dez 2020. , 2014
- WEN, Tom Sintan. **Acupuntura clássica chinesa**. [S.l.]: Editora Cultrix, 2011.
- WILLIAMS, R. E. e colab. **Frequency and severity of vasomotor symptoms among peri- and postmenopausal women in the United States**. Climacteric, v. 11, n. 1, p. 32–43, Fev 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202963>>. Acesso em: 13 maio 2020.
- XIE, Huisheng e PREAST, Vanessa. **Xie's veterinary acupuncture**. [S.l.]: Wiley Online Library, 2007. v. 463.
- XIE, Yong e colab. **The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling**. Journal of cellular and molecular medicine, v. 21, n. 5, p. 1033–1041, 2017.
- XU, Hong e colab. **The use of preventive strategies for bone loss**. American Journal of Chinese Medicine, v. 33, n. 2, p. 299–306, 10 Abr 2005.
- ZHOU, Jun e colab. **Effects of electroacupuncture on bone mass and cathepsin K expression in ovariectomised rats**. Acupuncture in Medicine, v. 32, n. 6, p. 478–485, 2014.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO E APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do mecanismo de ação e dos efeitos da acupuntura no tratamento da osteoporose pós-menopausa utilizando ratas ovariectomizadas como modelo animal", protocolada sob o CEUA nº 6126230419 (000000), sob a responsabilidade de **Mauro Cesar Isoldi e equipe; Pedro Henrique Paes Scott e Silva; Denise Coutinho de Miranda; Ana Beatriz Rezende Paula** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 28/06/2019.

We certify that the proposal "Investigation of the mechanism of action and effects of acupuncture in the treatment of postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats as an animal model", utilizing 80 Heterogenics rats (80 females), protocol number CEUA 6126230419 (000000), under the responsibility of **Mauro Cesar Isoldi and team; Pedro Henrique Paes Scott e Silva; Denise Coutinho de Miranda; Ana Beatriz Rezende Paula** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 06/28/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2019 a 05/2023** Área: **Ciências Biológicas**

Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Fêmeas	idade:	8 a 10 semanas	N:	50
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	180 a 250 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Fêmeas	idade:	8 a 12 semanas	N:	30
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	180 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: **Centro de Ciência Animal da UFOP**

Ouro Preto, 08 de julho de 2019

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

