

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

PÉROLA PADILHA GREGÓRIO DE GÓES

**INFLUÊNCIA DO ALENDRONATO DE SÓDIO E
RANELATO DE ESTRÔNCIO NA ESTRUTURA
ÓSSEA DA CABEÇA DO FÊMUR EM RATAS
SUBMETIDAS À SUPRESSÃO HORMONAL**

BAURU
2015

PÉROLA PADILHA GREGÓRIO DE GÓES

**INFLUÊNCIA DO ALENDRONATO DE SÓDIO E
RANELATO DE ESTRÔNCIO NA ESTRUTURA
ÓSSEA DA CABEÇA DO FÊMUR EM RATAS
SUBMETIDAS À SUPRESSÃO HORMONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
da Saúde da Universidade do Sagrado
Coração, como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Biomédicina, sob orientação da Prof.^a
Dr.^a Angela Mitie Otta Kinoshita.

BAURU
2015

G3891i	<p data-bbox="548 1388 964 1419">Góes, Pérola Padilha Gregório de</p> <p data-bbox="548 1457 1289 1581">Influência do alendronato de sódio e ranelato de estrôncio na estrutura óssea da cabeça do fêmur em ratas submetidas à supressão hormonal / Pérola Padilha Gregório de Góes. -- 2015.</p> <p data-bbox="591 1587 683 1619">47f. : il.</p> <p data-bbox="591 1654 1235 1686">Orientadora: Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.</p> <p data-bbox="548 1722 1289 1814">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1850 1289 1911">1. Osteoporose. 2. Ovariectomia. 3. Bifostonato. I. Kinoshita, Angela Mitie Otta. II. Título.</p>
--------	---

PÉROLA PADILHA GREGÓRIO DE GOES

**INFLUÊNCIA DO ALENDRONATO DE SÓDIO E RANELATO DE
ESTRÔNCIO NA ESTRUTURA ÓSSEA DA CABEÇA DO FÊMUR EM
RATAS SUBMETIDAS À SUPRESSÃO HORMONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel, em Biomédicina sob orientação da Prof.^a Dr.^a Angela Mitie Otta Kinoshita.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Angela Mitie Otta Kinoshita
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a M.^a Márcia Clélia Leite Marcelino
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dr.^a Camila Perez Buzalaf
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 01 de dezembro de 2015

Mãe: palavra pequena, mas com um significado infinito, pois quer dizer amor, dedicação, renúncia a si própria, força e sabedoria. Dedico este trabalho á você, pois sempre estive ao meu lado, nos dias bons, e ruins, na distância, no dia a dia. Obrigada por me ajudar a realizar esse sonho. *“Carrego no meu coração.”*
E.C.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora,

Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita, primeiramente pela oportunidade desenvolver este trabalho. Agradeço por toda atenção, todos os ensinamentos, pela paciência, pelo carinho, pela dedicação e principalmente por tratar seus orientandos como seus filhos. Por me auxiliar nos momentos em que tive dificuldades, e por sempre ser essa pessoa maravilhosa, atenciosa, serena, dedicada, que eu admiro muito. Obrigada pelo sempre bom humor, com certeza sentirei saudades.

À professora, Regina e Dalva,

Pela oportunidade de fazer parte da conclusão de seu doutorado, e assim auxilia-las em uma experiência inesquecível, cuja qual trago com orgulho para meu trabalho de conclusão de curso.

Ao professor, Geraldo,

Pela indicação e oportunidade no estágio realizado na Universidade São Paulo - USP, pelo aprendizado adquirido no grupo de estudo GEIM, pelo auxílio ha realizar uma das melhores experiências da minha vida que foi o intercambio e por me apresentar á minha querida orientadora. Obrigada.

Aos meus colegas de pesquisa, Mariana Marques e Leonardo Marques,

Que tivemos muitas manhãs de cirurgia e gavagem, mordidas de ratas, risadas e historias pra contar. Além do aprendizado e auxilio na conclusão deste trabalho.

À minha amiga e parceira de faculdade e de vida, Maria Julia Toledo,

Difícil agradecer por todo o companheirismo, caronas, risadas, vinhos, conversas, conselhos, ideias, e muito mais. Obrigada.

Aos funcionários da Universidade,

Maíra Couto e Wilson Orcini pelo apoio técnico, Prof, Dra. Dulce Constantino e funcionários do biotério pelos cuidados aos animais.

Ao meu Pai,

Meu querido pai, que mesmo longe sempre fez tudo que pode para estar perto, pela dedicação na realização deste meu sonho. Sou hoje resultado da suas batalhas, Obrigada, te amo.

Às minhas queridas avós, Manena e Nô,

Pelos ensinamentos, carinhos, broncas, comidinhas. Pelo exemplo de mulheres fortes. Minha avó Noêmia, mesmo não estando mais aqui neste plano, sei que sentirá muito orgulho do que me tornei, e me tornarei, seja de onde estiver. A saudade que sinto é imensa, mas sei que tenho quem me ilumina. Obrigada.

À minhas grandes amigas,

Ana Laura Guerra Mutro, Ana Carolina Penteadó, Giovana Damasceno e Fernanda Cal. Pela longa amizade desde o colegial, pelos bons momentos em minha vida, que puderam me proporcionar amadurecimento necessário para este momento que vivo agora. Momento que claro vocês estarão ao meu lado como nestes 15 anos de amizade. Obrigada.

À Universidade do Sagrado Coração,

A todos os professores que me deram a honra de participar de suas aulas, todos os funcionários que os ajudaram montando aulas e fazendo com que tudo ocorresse da melhor forma.

À Coordenadora do curso Prof.^a Daniela Nicolielo e a Prof.^a Dra. Leila Maria Vieira Diretora do Centro de Ciências da Saúde.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPQ, pelas três bolsas concedidas, sendo duas para pesquisa e outra como intercambio pelo Programa Ciências Sem Fronteiras.

À Prof.^a Dr.^a Sandra Fiorelli,

Pela dedicação e empenho, ao me auxiliar no intercâmbio realizado em Kent State University, Kent, Ohio.

Aos meus colegas de intercâmbio,

Queridos que agora mesmo com a distância sei que torcem por mim. Aline Segura, Hugo, Vitor, Rafaela, Fernando, Lara e Tarsis.

E finalmente a Deus,

Por fazer com que tudo isso deixasse de ser um sonho, e se tornasse realidade. Obrigada por essa realização.

“ A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A queda da mortalidade da população, seguida da redução da fecundidade e o aumento da expectativa de vida, resulta no envelhecimento da população levando ao aumento das taxas de doenças crônico-degenerativas, entre as quais a osteoporose. A osteoporose é uma doença que pode acarretar um enorme prejuízo na qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença em função das alterações no tecido ósseo, constantemente associada à ocorrência de fraturas devido à grande fragilidade dos ossos. Essas fraturas ocorrem com grande frequência no fêmur. Pesquisas que envolvem terapias para esta patologia são de grande importância, e podem ser conduzidas experimentalmente a partir do modelo de ovariectomia em ratas. Os bifosfonatos e o ranelato de estrôncio são os medicamentos mais usados para tratamento de osteoporose em mulheres pós-menopausa. Estes medicamentos agem como poderosos inibidores da atividade osteoclástica, mostrando alta afinidade pela matriz óssea mineralizada. Portanto, esse trabalho propôs o estudo do efeito destes medicamentos no *turnover* ósseo, através da análise microscópica do fêmur de ratas que sofreram ovariectomia e foram tratadas ou não com Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio. O alendronato de sódio possui grande afinidade pela matriz óssea e capacidade de inibir sua reabsorção. O medicamento Ranelato de Estrôncio é considerado uma nova terapia de tratamento e prevenção da osteoporose. Atua na formação e na reabsorção óssea, auxiliando tanto na produção óssea quanto na redução da reabsorção óssea. Foram utilizadas 108 ratas adultas *Wistar*, divididas em 6 grupos experimentais, OVX/ALD, OVX/RAE, OVX/NaCl e SHAM/NaCl, SHAM/ALD e SHAM/RAE. Os grupos OVX sofreram ovariectomia bilateral. Os grupos SHAM sofreram o mesmo procedimento cirúrgico sem a remoção dos ovários. Sessenta dias após esse procedimento, foi iniciado o tratamento diário, por via oral, sendo que o grupo OVX/ALD e SHAM/ALD foi tratado com Alendronato de Sódio e o grupo OVX/RAE e SHAM/RAE com Ranelato de Estrôncio e os demais grupos com NaCl. Após 30, 45 e 75 dias do início do tratamento, 6 animais de cada grupo sofreram eutanásia e o fêmur foi removido para a realização das análises. A morfometria do tecido ósseo mostrou o efeito protetor da massa óssea em decorrência dos tratamentos com Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio, pois o percentual obtido nos grupos OVX/ALD e OVX/RAE são maiores que no grupo OVX/NaCl ($p < 0.05$ ANOVA, Tukey). Sendo assim, os resultados do tratamento com drogas antirreabsortivas como o Alendronato de Sódio e o Ranelato de Estrôncio administrados em ratas ovariectomizadas e ratas normais proporciona a menor perda de tecido ósseo ao decorrer do período comparado com os grupos não tratados (NaCl).

Palavras Chaves: Osteoporose. Ovariectomia. Bifosfonato.

RESUMO INGLÊS

The decrease in mortality of the population, followed by the reduction of fertility and increasing life expectancy, resulting in an aging population leading to increased rates of chronic diseases, including osteoporosis. Osteoporosis is a disease that can cause a huge perjury in the quality of life the people affected by this disease due to changes in bone tissue, constantly associated with the occurrence of fractures due to the fragility of the bones. These fractures occur very frequently in the femur bone. Research involving therapies for this disease are of great importance, and can be conducted experimentally from ovariectomy model in rats. Bisphosphonates and strontium ranelate are the most commonly used drugs for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women. These drugs act as powerful inhibitors of osteoclast activity, showing high affinity for mineralized bone matrix. Therefore, this study proposed the study of the effect of these drugs on bone turnover, through microscopic analysis of rat femur that were either ovariectomized and treated or not with Alendronate Sodium and Strontium ranelate. Alendronate sodium has a high affinity for bone matrix and the ability to inhibit its reabsorption. Strontium ranelate The drug is considered a new therapy for treatment and prevention of osteoporosis. It acts in the formation and bone resorption, helping both bone production and the reduction of bone resorption. 108 Wistar adult rats were used, divided into 6 experimental groups, OVX / ALD, OVX / SAR, OVX / NaCl and SHAM / NaCl, SHAM / ALD and SHAM / SAR. The OVX groups underwent bilateral ovariectomy. The SHAM group underwent the same surgical procedure without removal of the ovaries. Sixty days after this procedure was initiated daily treatment orally, and the OVX / ALD and SHAM / ALD group was treated with Sodium Alendronate and OVX / SAR and SHAM group / SAR with Strontium ranelate and other groups with NaCl. After 30, 45 and 75 days from start of treatment, six animals from each group were euthanized and the femur was removed to begin studying. The morphology of bone tissue showed the protective effect of bone mass as a result of treatment with Sodium Alendronate and Strontium ranelate because the percentage obtained in OVX groups / ALD and OVX / RAE are higher than in the OVX group / NaCl ($p < 0.05$ ANOVA, Tukey). Thus, the results of antirreabsortivas treatment with drugs such as alendronate sodium and strontium ranelate administered in ovariectomized rats and normal rats gives the smallest bone loss during the period when compared with untreated groups (NaCl).

Palavras Chaves: Osteoporose. Ovariectomia. Bifosfonato.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Discriminação esquemática da cronologia do experimento.....	21
Figura 2. Realização do esfregaço vaginal.	22
Figura 3. Realização da administração da droga por meio de gavagem.	22
Figura 5. Animal em decúbito lateral previamente ao procedimento cirúrgico.....	23
Figura 6. Ilustração fotográfica do procedimento cirúrgico.....	24
Figura 7. Peças do fêmur fixadas em formol 10%.....	25
Figura 8. Realização do corte da cabeça do fêmur.....	26
Figura 9. Peças preparadas para inclusão.....	26
Figura 10. Fotografia do fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i.	27
Figura 11. Ilustração macroscópica do fêmur em preparo para corte.....	28
Figura 13. Fotomicrografia do grupo SHAM/ALD 90 dias	29
Figura 14. Fotomicrografia do grupo SHAM/ALD 90 dias	29
Figura 15. Fotomicrografia do grupo SHAM/ALD 90 dias.	30
Figura 16. Fotomicrografia do grupo SHAM/NaCl 105 dias.	30
Figura 17. Panorâmica Grupo OVX/NaCl 90 dias.....	31
Figura 18. Panorâmica Grupo OVX/RAE 90 dias.....	31
Figura 19. Panorâmica Grupo OVX/ALD 90 dias.....	32
Figura 20. Panorâmica Grupo OVX/NaCl 105 dias.	32
Figura 21. Panorâmica Grupo OVX/RAE 105 dias.....	33
Figura 22. Panorâmica Grupo OVX/ALE 105 dias.	33
Figura 23. Fotomicrografias do grupos.....	34
Figura 24. Morfometria do tecido ósseo do Grupo NaCl.....	36
Figura 25. Morfometria do tecido ósseo do Grupo Alendronato.....	36
Figura 26. Morfometria do tecido ósseo do Grupo Ranelato de Estrôncio.....	37
Figura 27. Morfometria do tecido ósseo. Letras iguais representam	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores que contribuem para perda óssea	15
Tabela 2. Descrição dos grupos de estudo	20
Tabela 3. Doses administradas de acordo com o medicamento	23
Tabela 4. Valor médio e desvio padrão da morfometria de tecido ósseo.....	35

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Objetivos	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 Metodologia	21
3.1 Local e Grupos de Estudo	21
3.2 Delineamento Experimental.....	22
3.3 Comprovação do ciclo estral.....	22
3.4 Tratamentos	21
3.5 Ovariectomia	24
3.5.1 Anestesia e Assepsia	24
3.5.2. Técnica cirúrgica.....	22
3.5.3. Preparo das Peças.....	26
3.5.5 Analise Microscópica	26
4. Resultados	29
4.1 Analise Macroscópica	29
4.2 Analise Microscópica	30
5 Discussão	41
Referencias	45
Anexos	47

1 Introdução

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), com deterioração da microarquitetura óssea que leva ao aumento da fragilidade do esqueleto e a um risco de fratura. A fratura por fragilidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “uma fratura causada por um trauma que seria insuficiente para fraturar um osso normal, resultado de uma redução da resistência compressiva ou torsional”. De acordo com os critérios propostos pela OMS, o diagnóstico da osteoporose é realizado nas estruturas da coluna lombar, do colo femoral proximal e/ou do fêmur total e antebraço. (STOLNICKI,2015) (COSTA, et al. 2015).

O impacto das fraturas por fragilidade no Brasil, nos mostra que o número de pessoas acometidas por esta doença chega a 10 milhões e os gastos com o tratamento e a assistência no Sistema Único de Saúde (SUS) são altos. No ano de 2010, o SUS chegou a gastar aproximadamente R\$ 81 milhões para a atenção ao paciente portador de osteoporose e vítima de quedas e fraturas. As projeções estimam que o número de fraturas de quadril por ano no Brasil (em 2010 cerca de 121.700) deve chegar a 160 mil até 2050. Sendo que, o estudo realizado pela Clínica Mayo demonstrou que entre 2000 e 2011 houve 4,9 milhões de hospitalizações por fraturas osteoporóticas. Portanto, a fratura por osteoporose tem elevada prevalência e representa importante problema de saúde pública no Brasil, especialmente a de quadril, cuja incidência aumenta com a idade e está associada à deterioração da qualidade de vida e à maior mortalidade. (COSTA, et al. 2015) (PINHEIRO, et al. 2010) (SINGER, et al. 2015).

A manifestação clínica da osteoporose está frequentemente associada a fraturas da coluna vertebral, do quadril e do punho; mesmo sem qualquer redução significativa na DMO ou sintoma ósseo, também é considerada osteoporose. São vários os fatores que envolvem o desenvolvimento de osteoporose; alguns deles não podem ser alterados, enquanto muitos outros podem ser modificados e reduzir a incidência de osteoporose. Os mais relevantes dos fatores que não podem ser alterados, ocorre em mulheres com idade aumentada, a baixa estatura, a etnia branca ou asiática e a hereditariedade. Dentre os fatores modificáveis, os mais relevantes são os hormônios sexuais, a anorexia, a falta de cálcio, a ingestão de

vitamina D, o uso de medicamentos (como glicocorticoides e anticonvulsivantes), o sedentarismo, o tabagismo e o uso abusivo de álcool. A menopausa tem uma forte influência sobre a perda óssea em mulheres, em razão do desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, além de ser determinado por uma diminuição na produção de estrogênio. (COSTA, et al. 2015)

Tabela 1. Fatores que contribuem para perda óssea.

Não modificáveis	Modificáveis
Idade avançada	Fumo
Sexo feminino	Ingestão baixa de cálcio
Raça caucasóide e faia (orientais)	Ingestão baixa de vitamina D
Desordens osteometabólicas	Baixa exposição solar
Malignidades (mieloma, linfomas)	Índice de massa corpórea baixo
História familiar de osteoporose	Sedentarismo
História familiar de fratura de quadril	Corticoterapia
Intolerância à lactose	Depressão/estresse

A fisiopatologia da osteoporose envolve a liberação de fatores de crescimento e citocinas. Manologas, sugeriu ser a interleucina 6 (IL-6) a citocina de maior importância na perda óssea quando ocorre disfunções gonadais, entretanto o seu papel parece ainda incerto, embora a IL – 1, o fator de necrose tumoral (TNF) e a IL-11 também possam participar dessa perda causada pela deficiência estrogênica. Porém, comparado com a IL-6, essas citocinas não são suprimidas pelos hormônios esteroidais, não podendo ser consideradas causadoras dessa condição patológica. Os hormônios sexuais têm importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea. Na literatura existem diversas evidências que a diminuição ou ausência de estrógenos leva a progressiva redução da massa óssea. (AMADEI, 2006).

Por estar em constante modificação, o desenvolvimento do tecido ósseo está sujeito a uma série de perturbações, dentre elas a supressão hormonal. A supressão hormonal biológica ou induzida cirurgicamente com a retirada dos ovários (ovariectomia) origina o que pode ser chamado de menopausa (climatério). Albright, em 1964, foi o primeiro a descrever a ocorrência dessa fragilidade óssea em mulheres no período pós-menopausa, definida como uma diminuição da massa e desarranjo da microestrutura óssea, que levam a um aumento do risco de fraturas. Portanto, a fragilidade óssea conduz à perda de substância óssea podendo acarretar

a desmineralização, devido à falha osteoblástica na formação do osso causada pela perda do estrogênio, dando origem a osteoporose. (BACCARO, 2014) (ALBRIGHT, 1964).

Sendo assim, as terapias desta condição patológica baseia-se em medicamentos que podem ser divididos em dois grupos, sendo eles:

- 1) Os inibidores da reabsorção óssea que atuam bloqueando a ação dos osteoclastos. Sendo estes os Bifosfonatos, os SERMS (moduladores de receptores de estrógenos), a calcitonina, os estrógenos e o denosumabe. (STOLNICKI, 2015).
- 2) Os ativadores da formação óssea que atuam como anabolizantes, aumentando o metabolismo ósseo, com predomínio de formação óssea por estimulação dos osteoblastos. São o hormônio das paratireoides (PTH), seu similar, a teriparatida, o hormônio do crescimento (GH) e os metabolitos ativos da vitamina D (alfacalcidol e calcitriol). (STOLNICKI, 2015).

Além destes dois grupos, existe outro medicamento que não se encaixa especificamente em nenhum grupo. O medicamento ranelato de estrôncio apresenta duplo modo de ação, pois atua tanto na inibição da reabsorção (inibição da ação dos osteoclastos) quanto na estimulação da formação óssea (estimulação dos osteoblastos). Demonstrou eficácia para redução de fraturas vertebrais, não vertebrais e quadril. Já os metabolitos ativos da vitamina D, calcitriol e alfacalcidol, aumentam a absorção de cálcio, podendo ter efeito direto nas células ósseas e também reduzir a incidência de fraturas. Os derivados ativos da vitamina D têm sido indicados para idosos debilitados, reclusos, pouco expostos ao sol, com osteoporose na dose de 0,5mcg/dia. Onde tem sido encontrados bons resultados na prevenção de fraturas ósseas. (STOLNICKI, 2015).

Nos últimos anos os bifosfonatos passaram a ser utilizados como tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo. Pois possuem grande afinidade pela hidroxiapatita, ligando-se fortemente à porção mineral do tecido ósseo, apresentam longo tempo de meia vida e são divididos em nitrogenados e não-nitrogenados. Os bifosfonatos que possuem nitrogênio em sua estrutura, agem na inibição da remodelação óssea mediada por osteoclastos, por interferir na prenilação de

algumas proteínas formadas na via do mevalonato, pela inibição da enzima farnesilpirofosfato sintase. Essas proteínas regulam processos importantes para a função dos osteoclastos e a organização celular, levando a célula à apoptose e à redução da atividade. Tais efeitos sobre os osteoclastos levam primariamente à inibição da reabsorção e, secundariamente, à diminuição do *turnover* ósseo (FLEISCH, 2002).

O alendronato de sódio é um bifosfonato amplamente empregado na prevenção e tratamento da osteoporose, aumentando a densidade mineral óssea e, conseqüentemente, reduzindo a incidência de fraturas. É administrado por via oral, em dose única diária ou semanal (CANETTIERI et al., 2009).

Observamos que em vários estudos onde houve ensaios clínicos, todos os agentes bisfosfonatos têm demonstrado eficácia na prevenção de fraturas vertebrais, mas somente o ácido zoledrônico, risedronato e alendronato, reduzem significativamente o risco de fraturas não vertebrais (pelve, fêmur distal, tibia proximal, costela, úmero proximal, antebraço e fêmur proximal). Além disso, a redução no risco de fratura de fêmur proximal (quadril) foi estabelecida apenas para o risedronato, alendronato e ácido zoledrônico. (WILKES, M., NAVICKIS, J., CHAN, W., LEWIECKI, M., 2010)

O ranelato de estrôncio trata-se de agente terapêutico com ação óssea anabólica e antirreabsortiva simultânea. Os achados indicam que o tratamento da osteoporose pós-menopáusia com o ranelato de estrôncio 2 mg/dia por 5 anos reduzem, de modo sustentável, a incidência de fraturas vertebrais e não vertebrais em cinco anos, demonstrando que essa medicação parece ser eficaz no tratamento da osteoporose pós-menopáusia em longo prazo. (WELLS, G.; CRANNEY, A.; PETERSON, J.; BOUCHER, M.; SHEA, B; ROBINSON, V. et al; 2008)

Como a osteoporose acomete em maior número as mulheres, os modelos de animais mais utilizados em estudos relacionados à desmineralização devido à supressão hormonal são ratas submetidas ao processo cirúrgico denominado ovariectomia. Os mecanismos que ocorrem nas ratas ovariectomizadas são os mesmos que ocorrem em humanos, mimetizando a condição pós-menopausa, e deve-se, principalmente, ao desbalanceamento no *turnover* ósseo, ou seja, a

reabsorção óssea excede a formação óssea levando à desmineralização (THOMPSON et al., 1995). Dessa forma, esse modelo é apropriado para estudos relacionados à osteoporose e tem sido utilizado em muitos trabalhos na investigação de novas terapias (YAMAGUCHI et al., 2012; NAM et al., 2012; LUZIVITO et al., 2011).

Esse trabalho consiste análise microscópica comparativa do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas não tratadas, ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio e ranelato de estrôncio, e não ovariectomizadas, utilizando-se o fêmur como região de estudo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar através da histomorfometria a influência do Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio na mineralização da região do fêmur em ratas ovariectomizadas, através da comparação com o grupo de ratas ovariectomizadas tratadas com NaCl e com ratas normais.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar, através da histomorfometria, o perfil de mineralização da região do fêmur de ratas ovariectomizadas e tratadas com Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio.
- Estudar, através da histomorfometria, o perfil de mineralização da região do fêmur de ratas ovariectomizadas e não tratadas.
- Estudar, através da histomorfometria, o perfil de mineralização da região do fêmur de ratas normais.
- Avaliar o efeito do Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio na mineralização da região do fêmur de ratas ovariectomizadas em comparação com ratas ovariectomizadas não tratadas e com ratas normais.

3 Metodologia

3.1 Local e Grupos de Estudo

Foram utilizadas neste estudo 108 ratas adultas Wistar, obtidas do Biotério da USC, Universidade Sagrado Coração. Durante o período experimental foram mantidas em caixas plásticas, alimentadas com água e ração *ad libitum*, num ambiente de temperatura e luz controladas (ciclo de 12 horas). Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais de 18 animais cada, descritos a seguir: SHAM OVX/NaCl, SHAM/ALD e SHAM/RAE e OVX/ALD, OVX/RAE, OVX/NaCl.

Tabela 2. Descrição dos grupos de estudo

Grupos	Descrição
1) SHAM/NaCl	Não sofreram ovariectomia e foram tratados com NaCl
2) SHAM/ALD	Não sofreram ovariectomia e foram tratados com Alendronato de Sódio
3) SHAM/RAE	Não sofreram ovariectomia e foram tratados com Ranelato de Estrôncio
4) OVX/NaCl	Sofreram ovariectomia e foram tratados com NaCl
5) OVX/ALD	Sofreram ovariectomia e foram tratados com Alendronato de Sódio
6) OVX/RAE	Sofreram ovariectomia e foram tratados com Ranelato de Estrôncio

3.2 Delineamento Experimental

Os animais dos grupos OVX sofreram ovariectomia e foram preservados por 60 dias. Os animais do grupo SHAM sofreram o mesmo procedimento, porém sem a remoção dos ovários. Após o período de preservação iniciaram-se os tratamentos com NaCl, Alendronato de sódio e Ranelato de estrôncio este tratamento estendeu-se até o final do experimento. Após 90,105 e 135 dias da ovariectomia 6 animais de cada grupo sofreram eutanásia. (Figura 1)

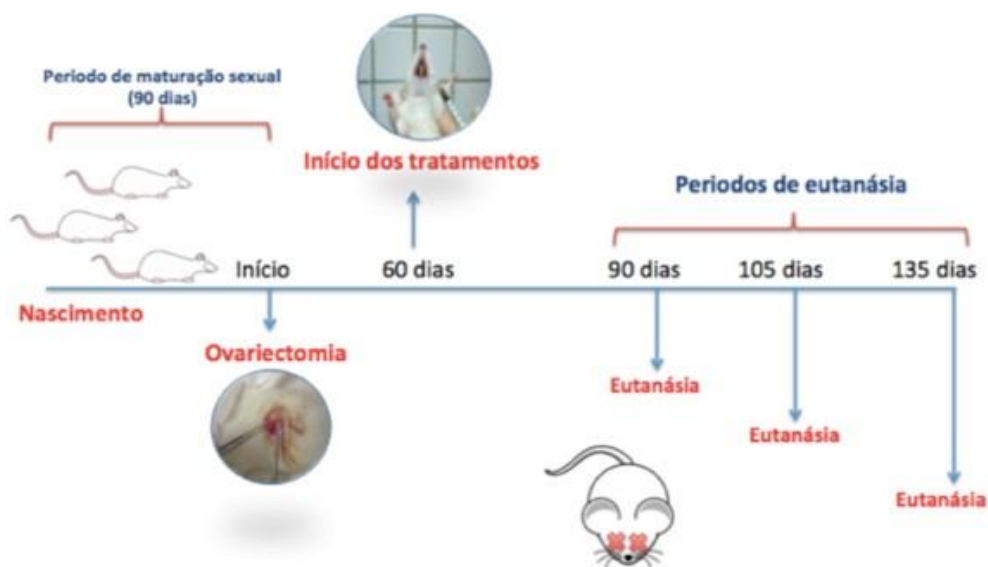


Figura 1. Discriminação esquemática da cronologia do experimento.

3.3 Comprovação do ciclo estral

Com a finalidade de comprovação da maturidade sexual das ratas, com base na presença de hormônios e com o intuito de comprovar a supressão hormonal pós ovariectomia, foi realizado esfregaço vaginal antes da realização da ovariectomia (Figura 2) e também 60 dias após esse procedimento para comprovação do Ciclo Estral na fase Diestro (aumento do número de leucócitos), através do *método de Shorr*. (SHORR, 1941).



Figura 2. Realização do esfregaço vaginal.

3.4 Tratamentos

A administração dos medicamentos foi feita por via oral através do método de gavagem oral. Foi utilizada uma cânula metálica própria para gavagem inserida no trato gastrointestinal, após a imobilização das ratas (Figura 3). Os medicamentos foram diluídos em água para que a dose, de acordo com a tabela 2, estivesse contida no volume de 1mL, que foi dado para cada animal.



Figura 3. Realização da administração da droga por meio de gavagem.

Tabela 3. Doses administradas de acordo com o medicamento.

Medicamento	Fornecedor	Grupo	Dose
Soro fisiológico	Arboreto, Juiz de Fora, MG, Brasil	NaCl	0,9%
Alendronato de sódio	Purifarma®, São Paulo, SP, Brasil	ALD	0,2mg/kg/dia
Ranelato de estrôncio	Protos®, Servier/Gidy-França	RAE	625 mg/kg/dia

3.5 Ovariectomia

3.5.1 Anestesia e Assepsia

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 90 mg/Kg (Dopalen® – Vetbrands, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina 10 mg/Kg (Rompum® Bayer, São Paulo, SP, Brasil), administradas por via intraperitoneal (IP). Após o início de ação da anestesia foi realizado os procedimentos de tricotomia e desinfecção na região a ser operada com PVPI (polivinilpiloridona).

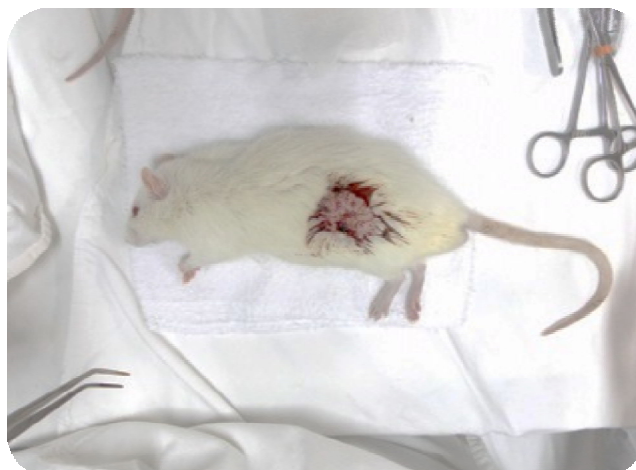


Figura 4. Animal em decúbito lateral previamente ao procedimento cirúrgico.

3.5.2. Técnica cirúrgica

Podemos observar na Figura 6 a ilustração fotográfica do procedimento cirúrgico. Na Figura 6 imagem A observamos o animal em decúbito lateral, anestesiado, imagem B e C podemos observar os tecidos que sofrerão divulsão e

exposição dos ovários e na imagem D podemos observar o momento da remoção dos ovários. Em seguida foi realizada a sutura do plano mais interno com fio reabsorvível (Vicryl 4-0®, Johnson & Johnson) e da superfície cutânea com fio de seda (Seda 4-0®, Johnson & Johnson). As cirurgias SHAM (cirurgias fictícias) foram realizadas expondo-se os ovários e em seguida os retornando intactos para a posição original e foram feitas as suturas por planos, com o objetivo de simular o estresse cirúrgico. Após as cirurgias, os animais receberam dose única de Enrofloxacino (Flotril® 2,5%, Schering-Plough) numa dose de 10,0mg/kg de peso corpóreo por via intramuscular. Como forma de analgesia foi aplicado por via subcutânea Dipirona Sódica (Dipirona Sódica®, 0,5 g/ml, Ariston).



Figura 5. Ilustração fotográfica do procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral em ratas wistar: A) Animal em decúbito lateral anestesiado, após tricotomia e desinfecção da região a ser operada com PVPI; B) Procedimento de divulsão dos tecidos; C) Exposição; D) Remoção dos ovários.

3.5.3. Preparo das Peças

Decorrido os períodos de observação de 90, 105 e 135 dias os animais sofreram eutanásia com administração EV de Barbitúricos na dose de 150,0mg/kg de peso animal. Subsequentemente, as peças de fêmur foram removidas e fixadas em formol a 10% por 48 horas para proceder as análises macroscópica, radiográfica e microscópica. (Figura 7)



Figura 6. Peças do fêmur fixadas em formol 10%

3.5.5 Análise Microscópica

As peças fixadas foram descalcificadas usando EDTA18% (ácido etilenodiaminotetracético). Para inclusão em parafina as peças foram previamente seccionadas conforme as Figuras 8 e 9, afim de obter imagens nas regiões de interesse. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal, com seis micrômetros de espessura e corados pelo método da hematoxilina/eosina (H.E.).



Figura 7. Realização do corte da cabeça do fêmur após a descalcificação para montagem das lâminas.

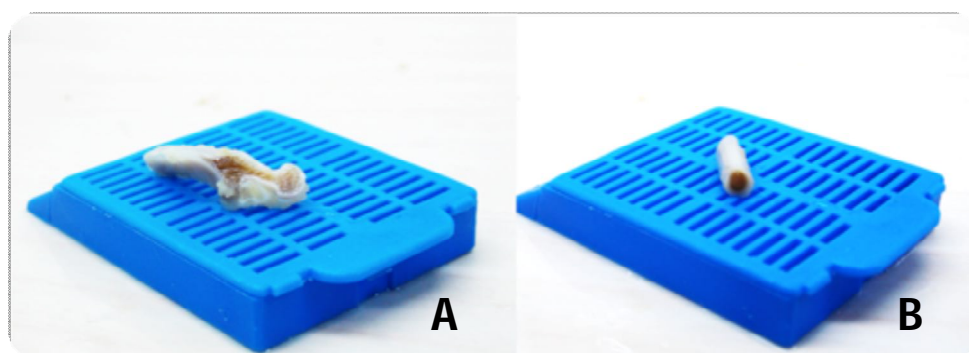


Figura 8. Peças preparadas para inclusão, Letra A região da cabeça do fêmur, e Letra B corte transversal no corpo do fêmur.

As lâminas foram observadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i, acoplado a um analisador de imagens (Image Pró-Plus® 5.1). Todas as imagens foram salvas para análise cuidadosa de todas as estruturas e tecidos presentes. (Figura 10).



Figura 9. Fotografia do fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i utilizado para a captura das imagens.

4. Resultados

4.1 Análise Macroscópica

Os espécimes foram analisados macroscopicamente nas suas dimensões e fotografados. As imagens foram capturadas usando câmera Nikon COOLPIX®. Não foi notada nenhuma diferença macroscópica nas amostras entre os grupos. A figura 10 mostra a imagem do fêmur do Grupo SHAM após fixação por 48 em formol. (Figura 11)



Figura 10. Ilustração macroscópica do fêmur em preparo para corte.

4.2 Análise Microscópica

A Figura 13 mostra fotomicrografia do corte transverso do fêmur de uma peça do grupo SHAM/ALD 90 dias, mostrando suas principais estruturas.

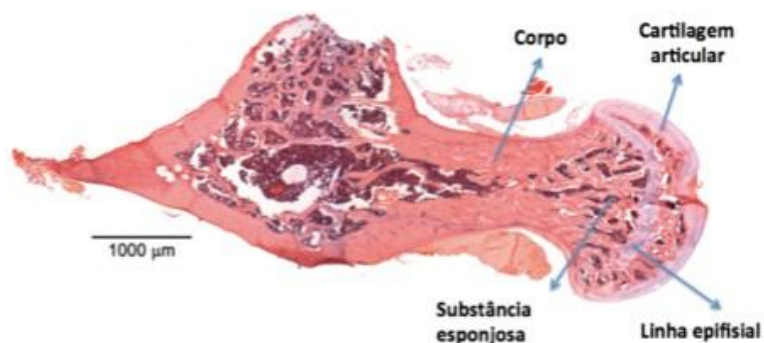


Figura 11. Fotomicrografia do grupo SHAM/ALD 90 dias mostrando as principais estruturas. Ampliação de 2 vezes, coloração H.E.

A área da cabeça do fêmur onde realizamos a comparação entre os grupos foi padronizada em forma de quadrante conforme a Figura 14.

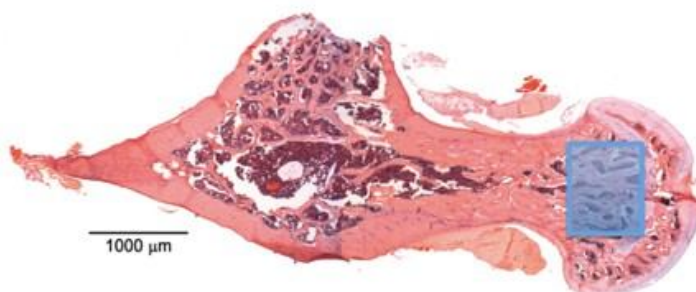


Figura 12. Fotomicrografia do grupo SHAM/ALD 90 dias demonstrando área padronizada para estudo.

A Figura 15 mostra uma fotomicrografia representativa do grupo SHAM 90 dias e a Figura 16 representa do grupo SHAM 105 dias. Nestes grupos não houve a retirada do ovário.

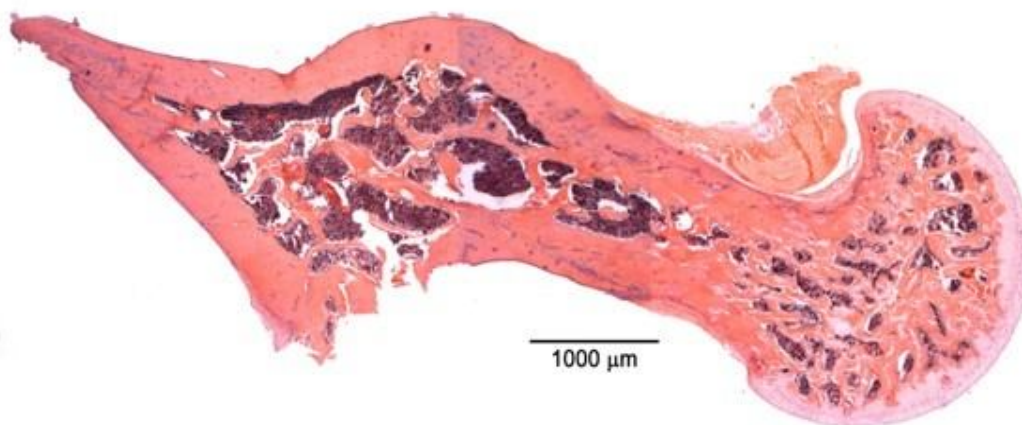


Figura 13. Fotomicrografia do grupo SHAM/ALD 90 dias.

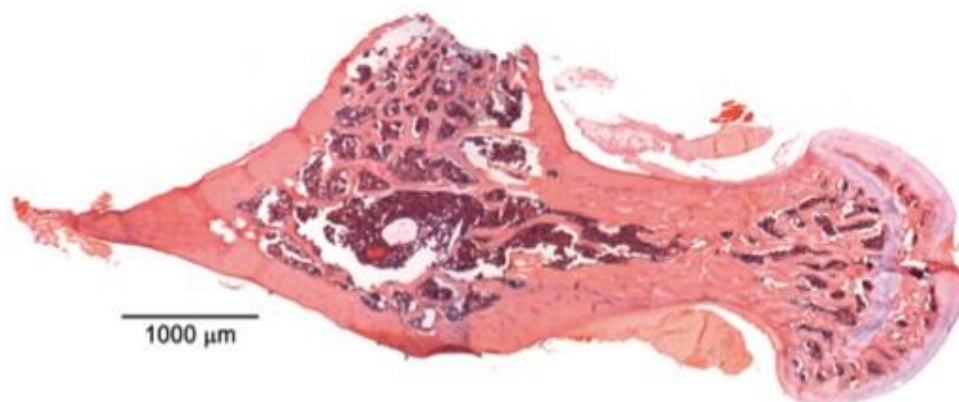


Figura 14. Fotomicrografia do grupo SHAM/NaCl 105 dias.

A Figura 17 mostra uma fotomicrografia do grupo OVX/NaCl 90 dias, que ilustra o início da formação das lacunas ósseas decorrentes da desmineralização óssea causada pela menopausa induzida cirurgicamente.

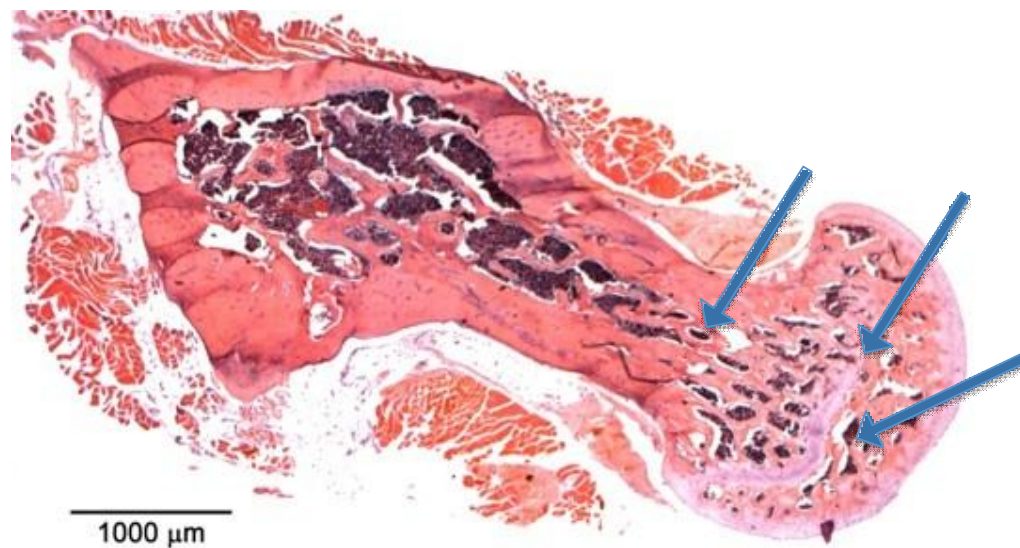


Figura 15. Panorâmica Grupo OVX/NaCl 90 dias. As setas indicam as lacunas ósseas.

Nas Figuras 18 e 19 estão mostradas as fotomicrografias dos grupos OVX/RAE e OVX/ALD onde podemos notar menor quantidade de lacunas ósseas, provavelmente em decorrência do tratamento.

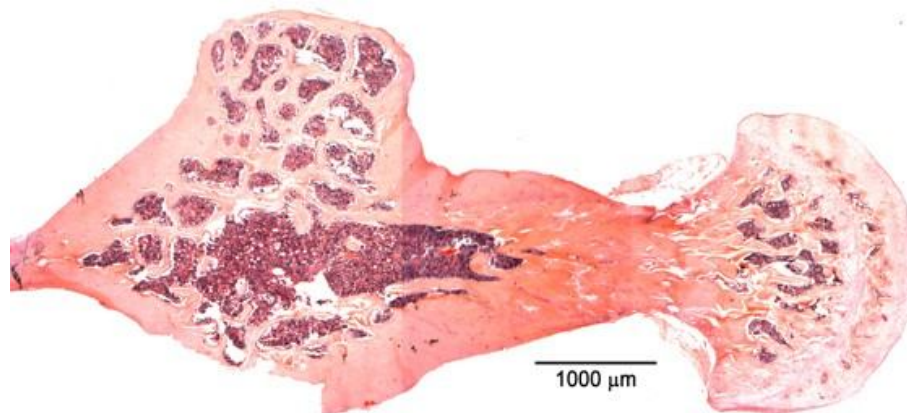


Figura 16. Panorâmica Grupo OVX/RAE 90 dias.

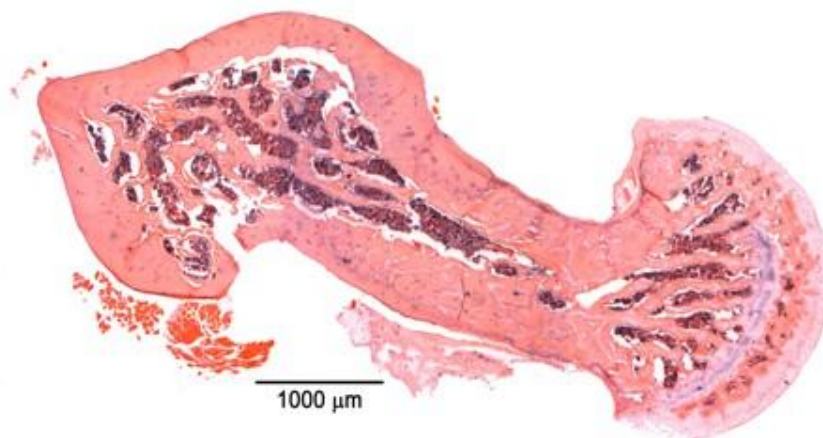


Figura 17. Panorâmica Grupo OVX/ALD 90 dias.

Na Figura 20 fotomicrografia do grupo OVX/NaCl 105 dias, podemos notar a existência de maiores lacunas ósseas em relação ao período de 90 dias.

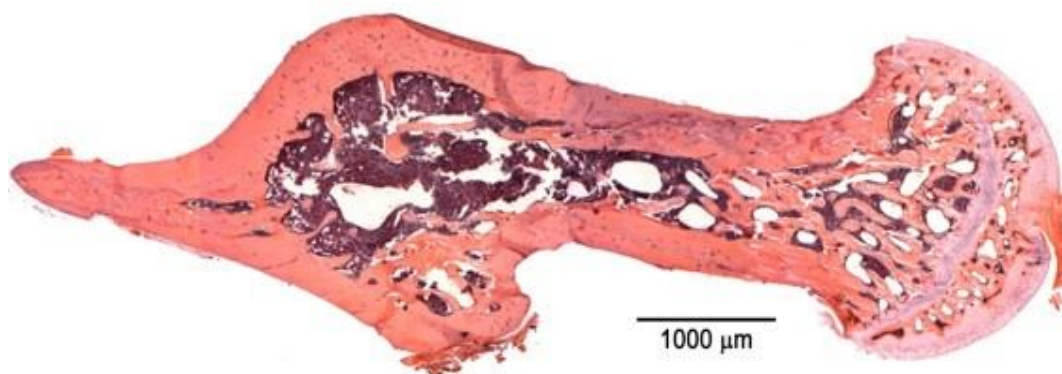


Figura 18. Panorâmica Grupo OVX/NaCl 105 dias.

Nas Figura 21 e 22 fotomicrografia do grupo OVX/RAE 105 dias e OVX ALD podemos notar lacunas ósseas menores e em menor quantidade em relação ao grupo OVX/NaCl (Figura 20).

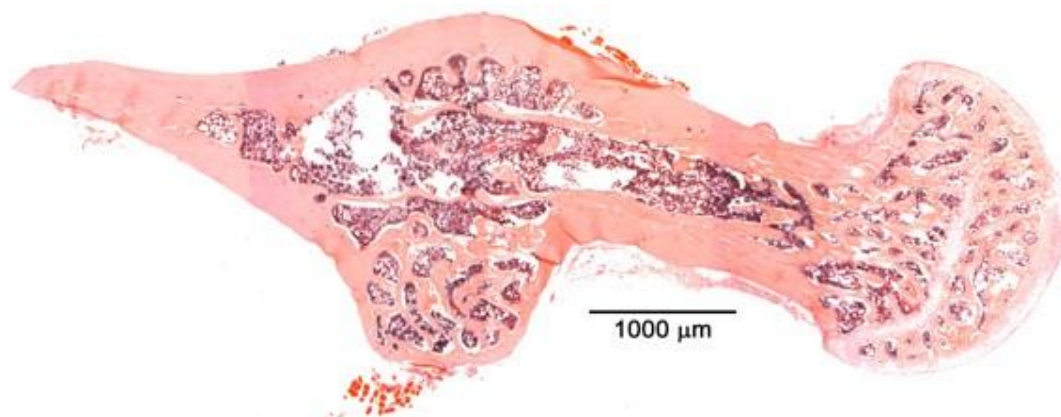


Figura 19. Panorâmica Grupo OVX/RAE 105 dias.

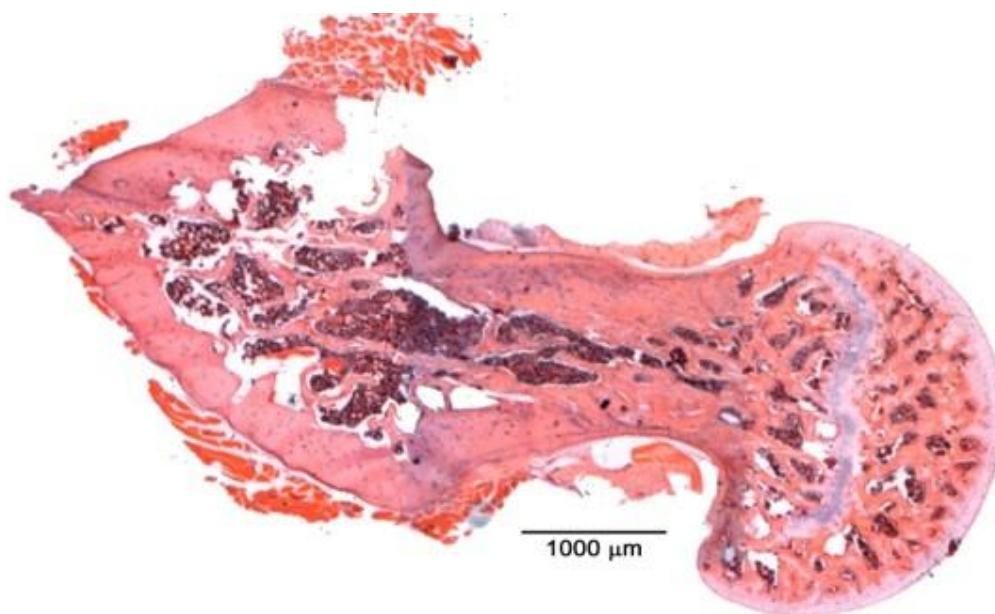


Figura 20. Panorâmica Grupo OVX/ALE 105 dias.

A Figura 23 ilustra fotomicrografias de todos os grupos analisados na região previamente padronizada da cabeça do fêmur, aumento 20x, nos períodos de 90,105 e 135 dias para demonstração da progressão do experimento.

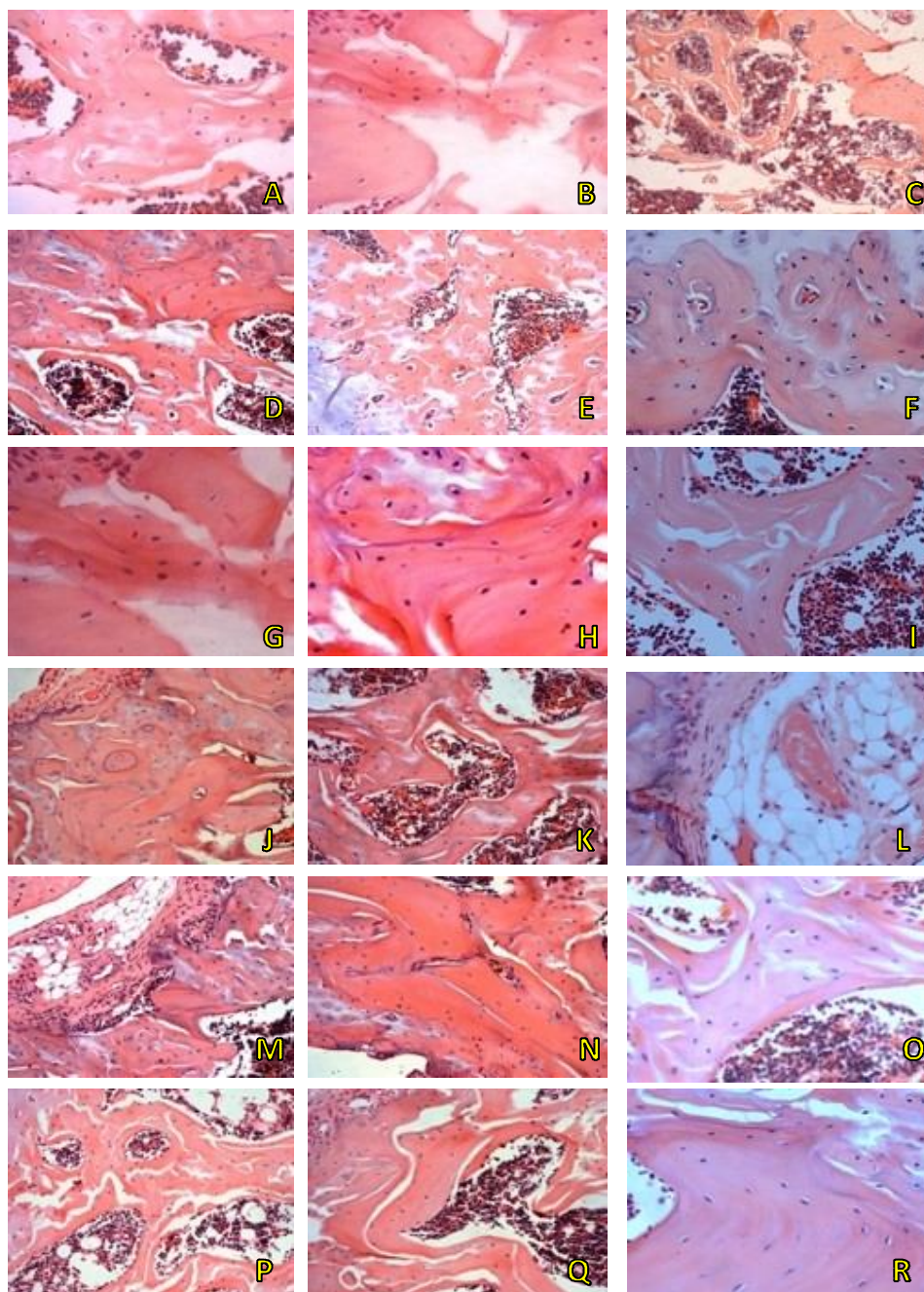


Figura 21. Fotomicrografias do grupos. (A)SHAM/NaCl 90 DIAS; (B) SHAM/NaCl 105 DIAS; (C) SHAM/NaCl 135 DIAS, (D)SHAM/ALD 90 DIAS; (E) SHAM/ALD 105 DIAS; (F) SHAM/ALD 135 DIAS, (G) SHAM/RAE 90 DIAS; (H) SHAM/RAE 105 DIAS; (I) SHAM/RAE 135 DIAS; (J) OVX/NaCl 90 DIAS; (K) OVX/NaCl 105 DIAS; (L) OVX/NaCl 135 DIAS, (M)OVX/ALD 90 DIAS; (N) OVX/ALD 105 DIAS; (O) OVX/ALD 135 DIAS, (P) OVX/RAE 90 DIAS; (Q) OVX/RAE 105 DIAS; (R) OVX/RAE 135 DIAS; aumento 20x, coloração HE.

A Tabela 4 mostra os resultados da média e desvio padrão da morfometria de Tecido ósseo de acordo com o grupo e os períodos de observação

Tabela 4. Valor médio e desvio padrão da morfometria de tecido ósseo.

Grupo/Período	90 dias	105 dias	135 dias
SHAM/NaCl	90,2 ± 4,7	92,2 ± 1,7	92,5 ± 2,6
SHAM/ALD	93,2 ± 6,2	91,5 ± 9,9	95,2 ± 3,7
SHAM/RAE	88,7 ± 10	90,7 ± 1,8	91,0 ± 3,5
OVX/NaCl	89,0 ± 6,9	82,5 ± 4,7	77,7 ± 2,6
SHAM/ALD	91,0 ± 2,5	89,7 ± 5,3	96,7 ± 2,2
SHAM/RAE	89,6 ± 6,0	89,2 ± 4,7	96,4 ± 1,6

As figuras 24,25 e 26 mostram a morfometria do tecido ósseo de acordo com os períodos de observação, respectivamente dos grupos NaCl, Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio. A Figura 27, mostra morfometria comparativa de todos os grupos e períodos. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

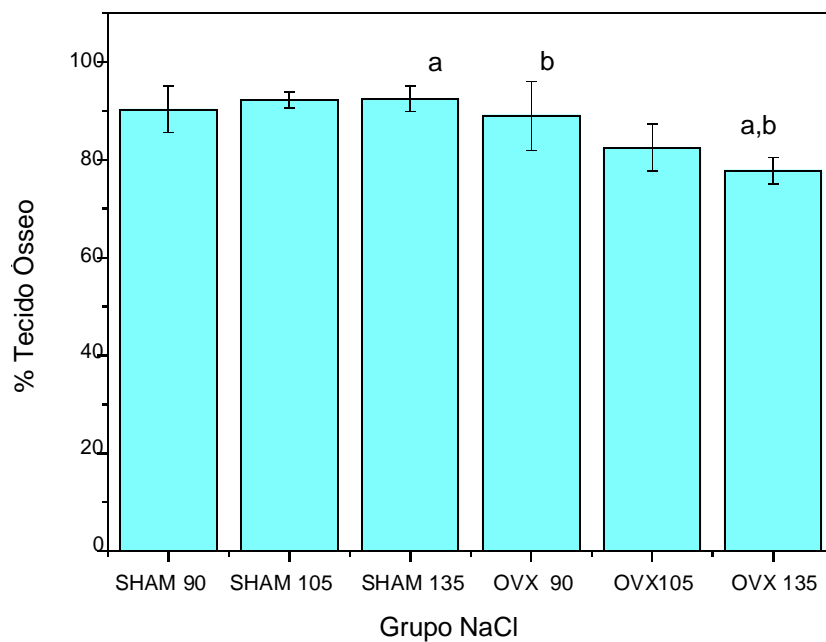


Figura 22. Morfometria do tecido ósseo do Grupo NaCl. Letras iguais representam $p < 0,05$ (ANOVA.Turkey).

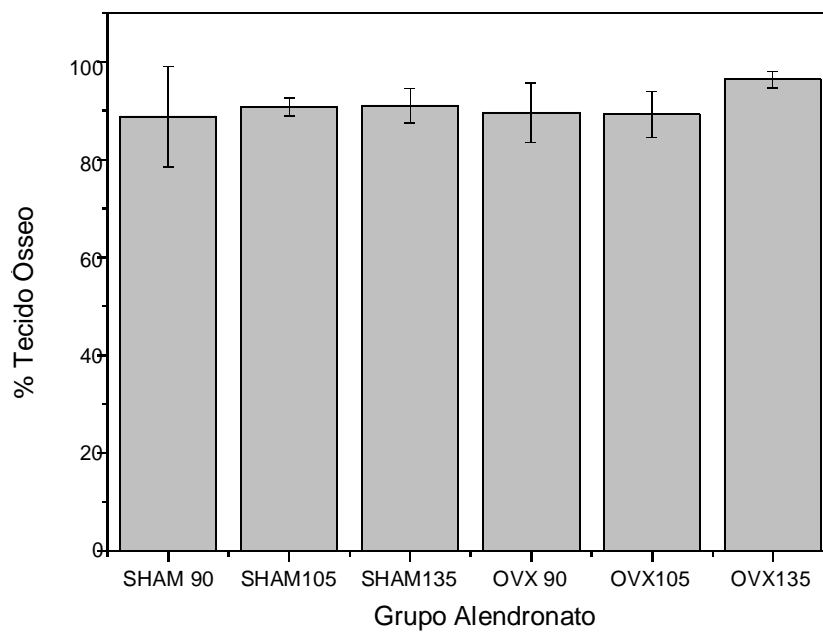


Figura 23. Morfometria do tecido ósseo do Grupo Alendronato. Letras iguais representam $p < 0,05$ (ANOVA.Turkey)

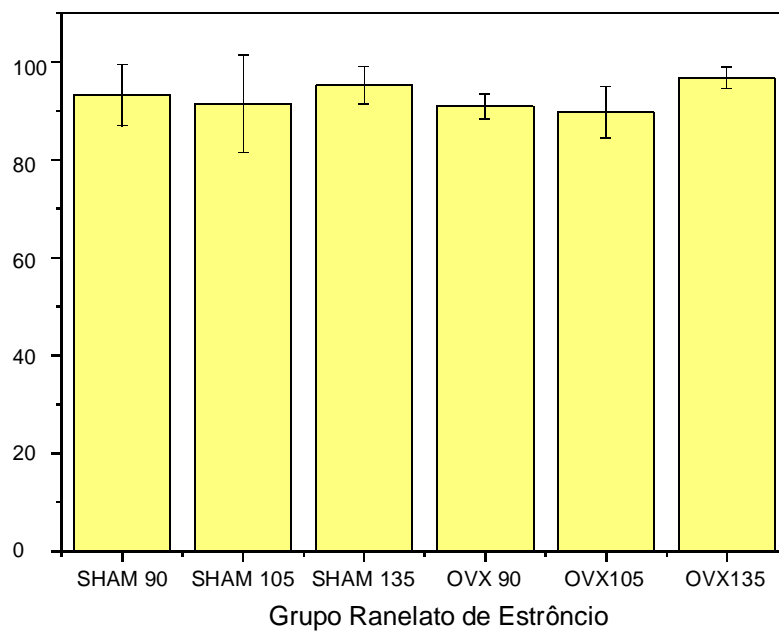


Figura 24. Morfometria do tecido ósseo do Grupo Ranelato de Estrôncio. Letras iguais representam $p < 0,05$ (ANOVA.Turkey).

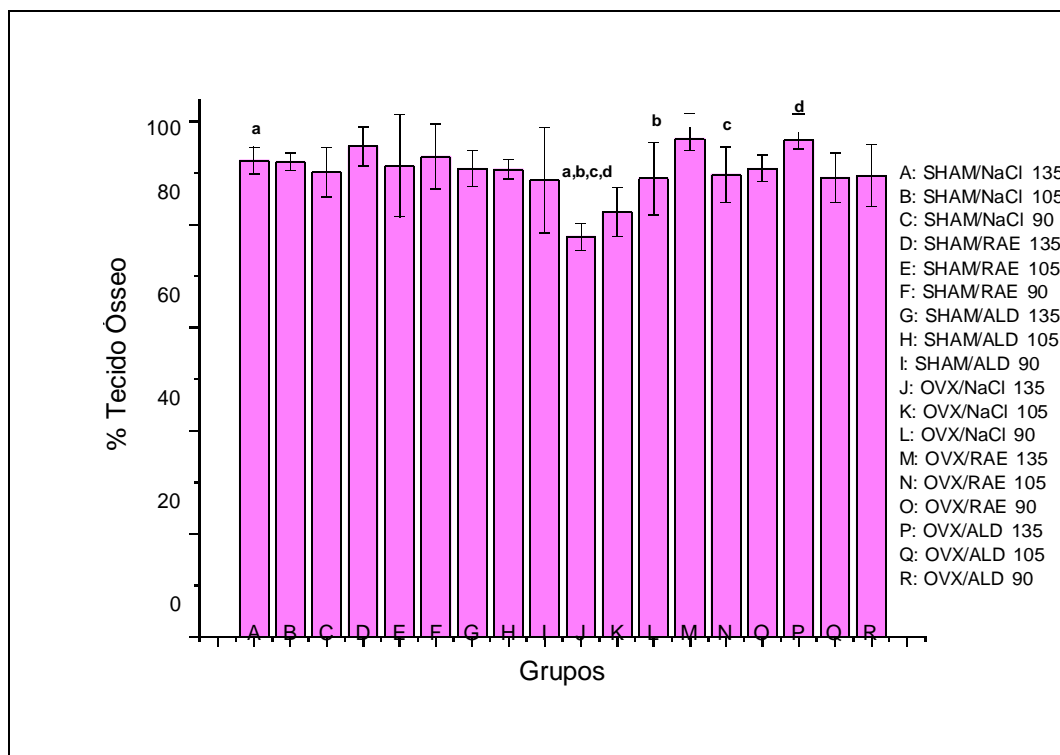


Figura 25. Morfometria do tecido ósseo. Letras iguais representam $p < 0,05$ (ANOVA.Turkey).

5 Discussão

A osteoporose é uma doença que representa um problema de saúde pública no Brasil, sendo assim vem se tornando cada vez mais importante seu estudo devido ao aumento da expectativa de vida junto ao envelhecimento da população, sendo mais frequente em mulheres, principalmente na pós menopausa. (POVOA, 2015).

Em 2010, um estudo epidemiológico realizado no Brasil, apresentou moderada incidência de fraturas em mulheres acima de 50 anos com osteoporose. Segundo esse estudo, a prevalência de fraturas de todos os tipos variou entre 11% e 24%, e a mortalidade após as fraturas, variou entre 22% e 30%, além de estarem associadas a altas taxas de incapacidade física, piora da qualidade de vida e excessivo impacto sobre o sistema de saúde. No Brasil, os gastos com o tratamento e a assistência no SUS em 2010 foram de aproximadamente R\$ 81 milhões para a atenção ao paciente portador de osteoporose e vítima de quedas e fraturas. (POVOA, 2015).

A osteoporose é definida como uma desordem esquelética caracterizada pela diminuição na força dos ossos, predispondo o indivíduo a sofrer fraturas. Por trata-se de uma doença multifatorial, dependendo tanto de fatores genéticos quanto ambientais, sendo a doença óssea crônica mais comum nos seres humanos. Recentemente, novas pesquisas foram realizadas descobrindo tratamentos para diversas enfermidades e para melhoria na estrutura de atendimento médico, levando melhor qualidade de vida para a população idosa. Entre outras patologias crônicas, destaca-se a osteoporose, com uma importância crucial na qualidade de vida da população idosa, sendo muito estudada recentemente. (BACCARO, 2014)

A osteoporose acomete em maior número as mulheres no período pós-menopausa, quando há um déficit hormonal causador da deficiência estrogênica. Portanto, os modelos de animais mais utilizados em estudos relacionados à desmineralização óssea devido à supressão hormonal são ratas submetidas ao processo cirúrgico denominado ovariectomia. Os efeitos da ovariectomia no metabolismo ósseo de ratas podem ser observados após 60 dias da cirurgia, tempo escolhido para este estudo (THOMPSON et al., 1995).

No presente estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, submetidas à ovariectomia bilateral. Observamos e comprovamos por meio do esfregaço vaginal, a eficiência do modelo de ovariectomia bilateral em ratas. A rata sexualmente madura apresenta seu ciclo estral dividido em quatro períodos distintos com características próprias: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro. Buscamos então a identificação citológica das características do período de Estro, este período corresponde à etapa de ovulação do animal, caso não haja ovulação, podemos confirmar a eficácia da menopausa induzida cirurgicamente. (MOREIRA et al., 2005).

Os mecanismos que ocorrem nas ratas ovariectomizadas são os mesmos que ocorrem em humanos, mimetizando a condição pós-menopausa, e deve-se, principalmente, ao desbalanceamento no *turnover* ósseo, ou seja, a reabsorção óssea excede a formação óssea levando à desmineralização. Dessa forma, o modelo de ovariectomia é apropriado para estudos relacionados à osteoporose, e tem sido utilizado em muitos trabalhos na investigação de novas terapias (THOMPSON et al., 1995) (YAMAGUCHI et al, 2012, NAM et al., 2012; LUZIVITO et al., 2011).

As fraturas que atingem a região proximal do fêmur merecem atenção pelo número elevado de sequelas, levando à incapacidade de autonomia e até à morte. A ocorrência de fraturas leva a maior necessidade de atendimento médico e ao consumo de medicamentos, causando a perda da qualidade de vida. Podemos assim justificar a necessidade de pesquisas pela busca de medicamentos que possam modificar este quadro (MESQUITA ,2009).

A osteoporose não tem cura, porém existem diversos tratamentos que visam impedir o agravamento da mesma. O tratamento tem como finalidade controlar a dor, retardar ou interromper a perda de massa óssea e prevenir fraturas. A escolha do tratamento irá depender da causa da doença, ou seja, se por excesso de reabsorção óssea ou por criação de massa óssea deficiente, ou ainda, se há outras patologias associadas. (DE ANDRADE, 2015).

O tratamento da osteoporose pode ser através de:

- a) Fisioterapia para estimular a formação óssea e fortalecer os músculos e articulações melhorando o equilíbrio e a coordenação motora.
- b) Terapia de reposição hormonal (TRH);
- c) Moduladores seletivos de receptores de estrógeno
- d) Bisfosfonatos;
- e) Calcitonina;
- f) Estimulantes de formação;
- g) Cálcio e vitamina D;
- h) Cirurgia de vertebroplastia ou cifoplastia;

No presente trabalho pudemos comparar os efeitos do bifosfonato alendronato de sódio com o estimulante de formação ranelato de estrôncio. Sendo que, o efeito primordial dos bisfosfonatos, é a inibição de reabsorção óssea, agindo exatamente no tecido ósseo e interferindo na ação dos osteoclastos. Acredita-se que os medicamentos em questão sejam internalizados pelos osteoclastos e interfiram com processos bioquímicos que resultam em apoptose. Estes medicamentos são utilizados atualmente para o tratamento de várias doenças caracterizadas pelo aumento da reabsorção óssea. (BERENSON, 2002).

Porém há relatos de reações adversas associadas ao uso prolongado destes agentes, como por exemplo, a fibrilação atrial e a osteonecrose de mandíbula. Além disso, apesar destes fármacos serem potentes inibidores da reabsorção, não exercem efeito na formação óssea. (POVOA, 2015)

O ranelato de estrôncio, quimicamente designado como 5-[bis(carboximetil)-amino]- 4-ciano-3-tiofenoacetato de diestrôncio, foi aprovado em 2004 pela *European Medicines Agency*, e em 2005 pela *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA), como princípio ativo de um medicamento oral desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopausa. (POVOA, 2015)

Alguns estudos farmacológicos, tanto em animais como estudos experimentais em células ósseas *in vitro*, puderam demonstrar que o ranelato de estrôncio atua através de um duplo mecanismo de ação, induzindo a formação de osteoblastos (células responsáveis pela formação de nova matriz óssea) e aumentando a síntese de colágeno (o principal componente da matriz orgânica do osso). Além disso, diminui a reabsorção óssea, induzindo a apoptose (morte celular)

dos osteoclastos (células responsáveis pela remoção de osso mineralizado). Em ratos normais, o ranelato de estrôncio induziu a formação óssea e a redução da reabsorção óssea, aumentando a densidade mineral óssea. Portanto, o ranelato de estrôncio é pró-formador e antirreabsortivo. (BARBARA, et al. 2004) (TAKAHASHI, et al. 2013) (CARVALHO, et al. 2014)

A região da cabeça do fêmur foi escolhida para verificar a eficiência dos bifosfonatos Alendronato de sódio e Ranelato de estrôncio, por representar uma área crítica para análise do comprometimento causado pela osteoporose e sendo um osso de possíveis fraturas. Durante o período de preservação os animais foram acompanhados e não houve nenhuma alteração significativa e nenhuma reação incomum dos animais.

Os resultados microscópicos demonstraram que os grupos (90, 105 dias e 135 dias) SHAM/NaCl, SHAM/ALD e SHAM/RAE, que sofreram apenas a exposição do ovário (“falsa” ovariectomia) não apresentou perda significativa de tecido ósseo.

Porém, a análise microscópica no período de 135 dias no grupo OVX NaCl, ou seja, o grupo ovariectomizado e não tratado, mostra o processo de degradação óssea bastante evidente. A morfometria do tecido ósseo comprova esta constatação, desde que o percentual de tecido ósseo nesse período é inferior ao observado aos 90 dias e essa diferença é estatisticamente significativa como mostrado na figura 27 ($p < 0.05$ ANOVA, Tukey). A morfometria do tecido ósseo mostrou também o efeito protetor da massa óssea em decorrência dos tratamentos com Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio, desde que o percentual obtido nos grupos OVX/ALD e OVX/RAE são maiores que no grupo OVX/NaCl ($p < 0.05$ ANOVA, Tukey) . Sendo assim, os resultados do tratamento com drogas antirreabsortivas como o Alendronato de Sódio e o Ranelato de Estrôncio administrados em ratas ovariectomizadas e ratas normais proporciona a menor perda de tecido ósseo ao decorrer do período comparado com os grupos não tratados (NaCl).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as duas drogas produzem efeitos semelhantes na prevenção de perda óssea em indivíduos com falta estrogênica comparado a indivíduos normais.

Concluimos que as drogas antirreabsortivas (Alendronato de Sódio e Ranelato de Estrôncio) diminuem a incidência de perda óssea em ratas ovariectomizadas com supressão estrogênica. Sendo que não obtivemos diferença estatística comparando o medicamento Alendronato de Sódio com Ranelato de Estrôncio tanto em ratas com metabolismo ósseo normal como naquelas com deficiência estrogênica.

REFERÊNCIAS

ALBRIGHT, F.; SMITH, P. H.; RICHARDSON, A. ostmenopausal Osteoporosis: its Clinical Features. **J.Am.Med.Assoc.** v.116, n. 1, p. 2465-74, 09.1941.

AMADEI, S. U.; PEREIRA, C. A.; CARVALO, Y. R.; A Influência Da Deficiência Estrogênica No Processo de Remodelação E Reparação Óssea. **Editorial** 5–12. 2006.

BACCARO; CINTRA, L; PAIVA, L; NETO, A.; "**Osteoporose.**" RBM rev. bras. med 71.3. 2014.

BARBARA, A.; DELANNOY, P.; DENIS, B. G.; MARIE, P. J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. **Metabolism. Clinical and Experimental**, 53, 532. 2004

CANETTIERI, A. C.V.; COLOMBO, C. E. D.; CHIN, C. M.; FAIG-LEIT, H.; Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 5, p. 520-526, 2009.

CARVALHO, R. C.; PEREIRA NETTO, A. D.; MARQUES, F. F. C. Simultaneous determination of strontium ranelate and aspartame in pharmaceutical formulation for the treatment of postmenopausal osteoporosis by capillary zone electrophoresis. **Microchemical Journal** 117, 214, 2014.

COSTA, A. L. D., et al. Osteoporose na atenção primária: uma oportunidade para abordar os fatores de risco. **Rev Bras Reumatol.** 2015.

DE ANDRADE, S. A. F. OSTEOPOROSE: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, 12.28: 41-47, 2015.

MOREIRA, A. C.; SILVA, M. A.; SANTOS, S. M.; SARDÃO, A. V. “Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Phytoestrogens as Alternative Hormone Replacement Therapy in Menopause : What Is Real , What Is Unknown.” **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** 143: 61–71, 2014.

PINHEIRO et al. The burden of osteoporosis in Brazil: regional data from fractures in adult men and women – **BRAZOS. Bras J Rheumatol** 2010;50(2):113-27

POVOA, Mayara N., et al. Permanganimetria para a Determinação de Estrôncio e Ranelato de Estrôncio em Formulação Farmacêutica para Tratamento da Osteoporose Pós-Menopausa. **Revista Virtual de Química**, 2015.

STOLNICKI, Bernardo; OLIVEIRA, Lindomar Guimarães. Para que a primeira fratura seja a última. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 2015.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; Ke, H.Z.; FDA Guidelines and animal models for Osteoporosis. **Bone**, v. 17, n.4, p.125S-132S, 1995.

YAMAGUCHI, M.; SAMESHIMA, H.; IKENOUE, T.; TSUBOI, M.; HIDAKA, M.; ARIMORI, K. Hyuganatsu Orange (Citrus tamurana Hort. Ex Tanaka) Contains a Water Soluble Substance That Suppresses Bone Loss in Ovariectomized Rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v.76, n.2, p. 364-367, 2012.

WELLS, G.; CRANNEY, A.; PETERSON, J.; BOUCHER, M.; SHEA, B; ROBINSON, V. Et al; Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**. 2008.

WILKES, M.; NAVICKIS, J.; CHAN, W.; LEWIECKI, M.; Bisphosphonates and osteoporotic fractures: a cross-design synthesis of results among compliant/persistent postmenopausal women in clinical practice versus randomized controlled trials. **Epub**, 21(4) : 679-88, 2010.

ANEXOS



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC**

CERTIFICADO

PROTOCOLO N° 31/13

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA analisou o projeto "Análise histomorfométrica e radiográfica comparativa do fêmur de ratas normais, ovariectomizadas não tratadas, tratadas com alendronato de sódio e ranelato de estrôncio", sob a responsabilidade das pesquisadoras Prof.ª Dulce Constantino e o considerou **APROVADO** com a seguinte recomendação:

- 1- Para eutanásia associar a lidocaína (10mg/ml) ao tiopental.

Bauru, 19 de Fevereiro de 2014.

Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA - USC

Francine Souza
Secretária CEUA - USC