

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

MARIANA MARQUES ESCOBAR BUENO

**HISTOMORFOMETRIA E ANÁLISE RADIOGRÁFICA
DO REPARO ÓSSEO EM RATAS NORMAIS E
OVARIECTOMIZADAS**

BAURU

2014

MARIANA MARQUES ESCOBAR BUENO

**HISTOMORFOMETRIA E ANÁLISE RADIOGRÁFICA
DO REPARO ÓSSEO EM RATAS NORMAIS E
OVARIECTOMIZADAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista em Odontologia sob orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

BAURU

2014

Bueno, Mariana Marques Escobar.

B9286h

Histomorfometria e análise radiográfica do reparo ósseo em ratas normais e ovariectomizadas / Mariana Marques Escobar Bueno -- 2014.

35f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Regeneração óssea. 2. Ovariectomia. 3. Osteoporose. I. Kinoshita, Angela Mitie Otta. II. Título.

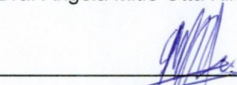
ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Mariana Marques Escobar Bueno.

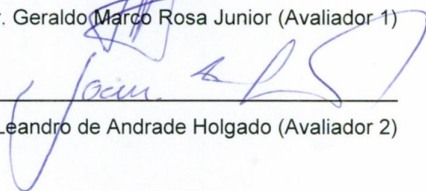
Ao dia dezessete de novembro de dois mil e quatorze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de MARIANA MARQUES ESCOBAR BUENO, intitulado: **"Histomorfometria e análise radiográfica do reparo ósseo em ratas normais e ovariectomizadas."** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Ângela Mitie Otta Kinoshita (orientadora), Dr. Geraldo Marco Rosa Junior e Ms. Leandro de Andrade Holgado. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprovar, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.



Dra. Ângela Mitie Otta Kinoshita (Orientadora)



Dr. Geraldo Marco Rosa Junior (Avaliador 1)



Ms. Leandro de Andrade Holgado (Avaliador 2)

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível.

A minha família, principalmente a minha mãe Rosana, pela força, empenho e dedicação para me dar a oportunidade fazer a faculdade e estar realizando meu sonho.

A meu pai Emile pelo amor, carinho.

Epígrafe

“ Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai – vos de que as grandes coisas do homem não foram conquistadas do que parecia impossível ”

- Charles Chaplin

Agradecimentos

A minha orientadora, Profa. Dra. Ângela, pela credibilidade, atenção, confiança.

As Professoras Regina e Dalva pela colaboração, atenção, dedicação e carinho.

A minha mãe Rosana, pelo exemplo de integridade, honestidade, pelo amor, empenho, educação, oportunidades, sacrifícios e incentivo ilimitados. Você é meu espelho e minha maior inspiração de vida.

A meu pai Emile por ter acreditado em mim e ter feito esse sonho tornar-se realidade.

A minha vó Ana, pelos exemplos de vida, de amor, de família, de união e carinho.

Aos meus amigos Júlia, Flaviana, Thais, Fernanda, Mara, Marina, Natalia, Buba, Wilson, Tex., Cida, Dani Fernandes, Amanda Ungri, Fabio, Isabela, Victoria pelo carinho, cumplicidade e apoio.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo carinho e respeito e em particular a Pérola, pelo incentivo, atenção, inspiração e contribuições acadêmicas.

A meu padrinho Álvaro pela confiança em mim e apoio tanto no trabalho como no meu dia a dia.

A minha companheira de pesquisa Pérola que desde o primeiro contato com os ratinhos esteve do meu lado, contribuindo para meu crescimento profissional e da minha vida.

A Prof. Leandro, pelas valiosas contribuições, dedicação, incentivo, amizade, carinho, cuidados e preocupação.

A Prof. Geraldo pela contribuição na minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Obrigada pela amizade e por ter acreditado no meu trabalho desde o primeiro momento.

A Leonardo Marques, pelo companheirismo, amizade, carinho, disponibilidade, incentivo e auxílio, sem você certamente este projeto não seria realizado.

A Wilson (Laboratório de Biologia molecular) que sem ele as imagens não ficariam tão lindas.

A Bruno por ter me ajudado na elaboração desse trabalho desde o dia em que a bolsa foi aprovada até a finalização do mesmo, e por ter tido paciência na confecção do trabalho.

A Karla Massari, porque foi a pessoa mais presente em minha vida. E sempre pude contar com sua amizade, seu companheirismo, sua compreensão, e incansável ajuda. Tem um grande coração e todos aqueles que cruzaram sua vida e precisaram

de ti, com certeza sabem disso. Cada dia aprendo que nada fazemos sozinhos e não há nada mais nobre do que ajudar os outros, Deus a abençoe e te guarde sempre.

Aos professores pelo crescimento acadêmico.

Àqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

Os eventos biológicos que estão envolvidos no processo de reparação óssea são afetados por diversos fatores, incluindo a osteoporose. A osteoporose retarda o processo e o seu completo entendimento é grande importância clínica e pode ser extrapolada por meio de modelos animais. Um dos modelos animais mais utilizados em estudos relacionados à perda óssea devido à supressão hormonal é de ovariectomia em ratas. 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, onde a reabsorção óssea excede a formação óssea levando à desmineralização. Vários estudos que caracterizam o processo de reparo ósseo usando esse modelo foram conduzidos utilizando a região do fêmur como local de estudo, devido à maior frequência de fraturas nessa região. Porém, poucos estudos foram realizados na região da calvária, cuja constituição óssea é também de grande interesse, especialmente na odontologia, por apresentarem a mesma origem embriológica da maxila e da mandíbula (Intramembranosa). Levando em consideração que a reparação óssea está associada às cirurgias odontológicas, a caracterização desse processo nessa região é de grande interesse científico e clínico. Neste projeto o processo de reparo ósseo foi estudado por histomorfometria e por análise radiológica. Foram utilizadas 36 ratas, divididas em 2 grupos experimentais, OVX (ovariectomia) e SHAM (controle). O grupo OVX sofreu ovariectomia bilateral e o grupo SHAM sofreu o mesmo tratamento cirúrgico sem remoção dos ovários. Noventa dias após esse procedimento, os animais foram realizados defeitos críticos na calota craniana com auxílio de uma trefina de 5mm de diâmetro. Após os períodos de 7, 15 e 45 dias, 6 animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia com dose letal de barbitúrico e as peças foram removidas para as análises radiográfica e microscópica. Nas radiografias é possível visualizar a área do defeito ósseo e notar maior radiopacidade no grupo SHAM, aos 45 dias. Apesar de dados da histomorfometria do tecido ósseo não serem diferentes estatisticamente ($p > 0.05$, *t*-Student), nas imagens microscópicas é possível notar processo de reparação óssea mais avançada no grupo SHAM, verificando-se que pode haver influência da deficiência estrogênica no reparo ósseo.

Palavras Chaves (DECS): Regeneração óssea, Osteoporose, Ovariectomia, Calota craniana.

Abstract

The biological events involved in bone repair are affected by several factors including osteoporosis. Osteoporosis delays the process and its complete understanding is clinically important and can be extrapolated using animal models. One of the most used animal models in studies related to bone loss due to hormone suppression is ovariectomy in rats. The mechanisms that occur in ovariectomized rats are the same as occur in humans, mimicking the post-menopausal condition. It is due primarily to the imbalance in bone turnover, where bone resorption exceeds bone formation leading to demineralization. Several studies that characterize the process of bone repair using this model were conducted using the region of the femur as the study site because of the greater frequency of fractures in this region. However, few studies have been conducted in the region of the calvaria, whose bone formation is also of great interest, especially in dentistry, because they have the same embryological origin of the maxilla and mandible (intramembranous). Since bone repair is associated with dental surgery, the characterization of this process in this region is of great scientific and clinical interest. In this work the process of bone repair was studied by histomorphometry and radiological analysis. Thirty six rats were used, divided into 2 groups, OVX and SHAM. The OVX group underwent bilateral ovariectomy and SHAM group underwent the same surgical treatment without removal of the ovaries. Ninety days after this procedure, the animals underwent craniotomy to induce defects of 5mm diameter. After periods of 7, 15 and 45 days, 6 animals from each group were euthanized with a lethal dose of barbiturics and sample containing bone defects were removed for microscopic and radiological analysis. Radiographs from SHAM group at 45 days post-surgery reveals area of the bone defect with higher radiopacity in comparison with OVX group. Although the histomorphometric data of bone tissue does not result in statistically significant differences ($p > 0:05$, t -Student) in microscopic images is possible to observe the process of bone repair most advanced in the SHAM group, indicating possible influence of estrogen deficiency on bone repair.

Key Words (DECS) : Bone regeneration Osteoporosis Ovariectomy Skull

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. Metodologia.....	17
3.2. Delineamento Experimental.....	18
3.3. Procedimentos Cirúrgicos.....	18
3.3.1 Anestesia e Assepsia	18
3.3.2 Ovariectomia	19
3.3.4 Craniotomia	20
3.4. Preparo das Peças	21
3.5. Análise Radiográfica.....	22
3.6. Análise Microscópica.....	22
3.7. Histomorfometria.....	22
3.8 Análise estatística.....	23
4. Resultados.....	24
4.1 Análise Macroscópica.....	24
4.2 Análise Microscópica.....	24
4.3 Análise Radiográfica.....	28
4.4 Histomorfometria.....	29
5. Discussão	30
6. Referências	32
ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	36

1.Introdução

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Apesar de sua resistência às pressões e de sua dureza, é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido normalmente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Possui alto teor de regeneração (habilidade das células de restaurarem um órgão ou tecido danificado ou perdido) quando comparado a outros tecidos dos mamíferos, uma vez que o processo de reparo segue etapas semelhantes ao processo de desenvolvimento embrionário do osso (BEHONICK et al., 2007).

A resistência e integridade do tecido ósseo dependem da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção pelos osteoclastos e a formação pelos osteoblastos. Com o envelhecimento ou como resultado de alguma alteração metabólica, este equilíbrio pode ser deslocado a favor dos osteoclastos de forma que a reabsorção excede a formação óssea, tornando os ossos frágeis e predispostos a fraturas (RODAN & MARTIN, 2000). Em adultos normais, há um equilíbrio entre a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos e a quantidade de osso formada pelos osteoblastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; NANJI, 2008; BRUZZANITI e BARON, 2006; ASAGIRI e TAKAYANAGI, 2007). O desequilíbrio entre o processo de reabsorção e aposição óssea pode resultar em diversas doenças como osteoporose (MACLEAN et al, 2008).

Existe uma relação bem definida entre a deficiência dos hormônios sexuais e o osso, uma vez que os estrógenos e andrógenos são necessários no processo de formação, maturação e remodelação óssea; existindo receptores desses hormônios nos osteoblastos, sendo estes essenciais no desenvolvimento do esqueleto (FALONI, CERRI, 2007; FOLWARCZNA et al., 2007)

Osteoporose é definida internacionalmente como uma doença sistêmica progressiva caracterizada por diminuição de densidade óssea e microarquitetura deteriorada do esqueleto, que leva ao aumento da fragilidade óssea e a susceptibilidade a fraturas. Com a supressão ovariana que ocorre na menopausa, ambas as etapas da remodelação óssea são exacerbadas, sendo a reabsorção de forma mais proeminente que a formação, gerando assim perda óssea e predispondo as fraturas (DUBNOV G et al, 2003).

A osteoporose é caracterizada por uma redução crônica e progressiva na densidade mineral e da matriz óssea, tendo como resultado a perda óssea e mudanças em sua microarquitetura, tornando o osso frágil e propício a fraturar-se facilmente. Geralmente essa perda óssea é mais marcante no osso trabecular do que no osso cortical (KAZANAVICUS et al., 2003; PATEL, MURPHY, 2006).

Na osteoporose, os ossos tornam-se menos resistentes, mas a concentração de cálcio na matriz orgânica é normal. Todavia a quantidade de tecido ósseo é menor, apresentando o osso com amplos canais de reabsorção (ECKEL LA, GEARY N, 2001). Assim, a osteoporose é uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea, que é uma combinação entre qualidade e densidade óssea, predispondo indivíduos ao risco aumentando de desenvolver fraturas (CEBRIAN et al., 2005).

A osteoporose na menopausa é de extrema relevância para a área da saúde, posto que constitui uma das doenças metabólicas ósseas mais comuns e significativas. A diminuição do estrógeno é o fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose após a menopausa (GERY N, ASARIAN L, 2001).

Na menopausa, a principal alteração biológica é o cessar da ovulação, confirmada quando a menstruação se interrompe por pelo menos um ano. (ULRICH *et al.*, 1996). Após a menopausa, os ovários tornam-se inativos e ocorre mínima ou nenhuma liberação de estrogênio, coincidindo com a redução da absorção de cálcio pelo intestino, devido à baixa produção de calcitonina, hormônio que inibe a desmineralização óssea. (SHAW & WITZKE, 1998).

Em mulheres na pós-menopausa, quedas parece ser o fator mais importante para fraturas e se relacionam com a idade e densidade mineral óssea. Já está estabelecido na literatura que baixa densidade óssea é fator preditivo importante para o risco de fraturas. Estudos mostram que a osteoporose pós-menopáusia e a ocorrência de quedas são fatores de risco para fraturas, devendo ser evitados, a fim de que haja uma redução na ocorrência de fraturas ósseas (SIRIS ES, et al., 2006).

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), na integração de biomateriais para aumento do volume ósseo para colocação de implantes (FUEGL et al., 2011). No período de três meses após a remoção dos ovários é suficiente para que ocorra uma significativa perda de massa óssea no fêmur de ratas ovariectomizadas (L. Hernandez et al.,2012)

Sendo assim, conhecendo-se a capacidade de reparação do tecido ósseo e as alterações decorrentes da supressão hormonal, esse projeto propõe o estudo do reparo ósseo em ratas normais e ratas ovariectomizadas, através de defeitos cirúrgicos realizados na calvária por meio radiográfico e microscópico. Devido à relação entre menopausa e osteoporose, este trabalho torna-se muito importante ao cirurgião dentista, pois a reparação óssea está associada às cirurgias odontológicas, tais como os implantes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar através da histomorfometria e da radiografia, a influência da supressão hormonal decorrente da ovariectomia no reparo ósseo, através de modelo animal. Esse estudo simula os efeitos das cirurgias odontológicas em pacientes portadores de osteoporose pós menopausa.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar através da histomorfometria o progresso do reparo ósseo em ratas normais e ovariectomizadas, submetidas à craniotomia.
- Estabelecer o padrão radiográfico do reparo ósseo em ratas normais e ovariectomizadas submetidas à craniotomia.

3. Metodologia

3.1 Local e Grupos de Estudo

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade de Marília (CEUA - UNIMAR, anexo I). Foram utilizadas neste estudo 36 ratas adultas (90 dias) Wistar, obtidas do Biotério da USC, Universidade do Sagrado Coração. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em caixas plásticas, alimentados com água e ração *ad libitum*, em um ambiente de temperatura e luz controladas (ciclo de 12 horas). Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos experimentais de 18 animais cada, descritos a seguir:

Ovariectomia (OVX) – sofreram ovariectomia

Controle (SHAM) – ovariectomia simulada



N=36



OVX: N=18



SHAM: N=18

N=6



N=6



N=6



Figura 1. Esquema da divisão de grupos (Total N=36)

3.2. Delineamento Experimental

Os animais do grupo OVX sofreram remoção cirúrgica bilateral de seus ovários (ovariectomia) e o do grupo SHAM sofreram o mesmo tratamento cirúrgico sem a remoção dos ovários (Ovariectomia simulada). Passados os 90 dias realizou-se cirurgicamente um defeito circular de 5 mm na calvária dos animais. Após 7, 15 e 45 dias, os animais foram eutanasiados e as peças das calotas removidas para análises microscópica e radiográfica.

3.3. Procedimentos Cirúrgicos

3.3.1 Anestesia e Assepsia

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intramuscular (IM) de cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil) 1ml/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intramuscular de anestésico geral de cloridrato de Ketamina (Dopalen – Vetbrands, São Paulo, Brasil) 100mg/kg de peso corpóreo (Figura 2).

Após o início de ação da anestesia foram realizados os procedimentos de tricotomia e desinfecção da região a ser operada com PVPI (polivinilpiridona).



Figura 2. Relaxante Muscular (Anasedan) e Anestésico Geral (Dopalen)

3.3.2 Ovariectomia

Foram realizadas ovariectomias bilaterais com incisões em ambos os flancos, exposição dos ovários, ligadura da tuba uterina com fio reabsorvível (Vicryl 4-0®, Johnson & Johnson) e remoção cirúrgica dos mesmos (Figura 3). Em seguida a sutura do plano mais interno foi feita com fio reabsorvível (Vicryl 4-0®, Johnson & Johnson) e a superfícies cutânea com fio de seda (Seda 4-0®, Johnson & Johnson). As cirurgias SHAM (cirurgias fictícias) foram realizadas expondo-se os ovários e em seguida retornando-os 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 Enrofloxacino (Flotril® 2,5% - Schering-Plough) numa dose de 10,0mg/kg de peso corpóreo 1x ao dia por 7 dias por via subcutânea. Como tratamento analgésico Dipirona Sódica (Dipirona Sódica®, 0,5 g/ml, Ariston) numa dose de 25mg/kg de peso corpóreo 2x ao dia durante 3 dias por via subcutânea.

Decorridos os períodos de observação de 7, 15 e 45 dias da craniotomia, os animais foram eutanasiados por uso de barbitúricos 150mg/kg via EV.

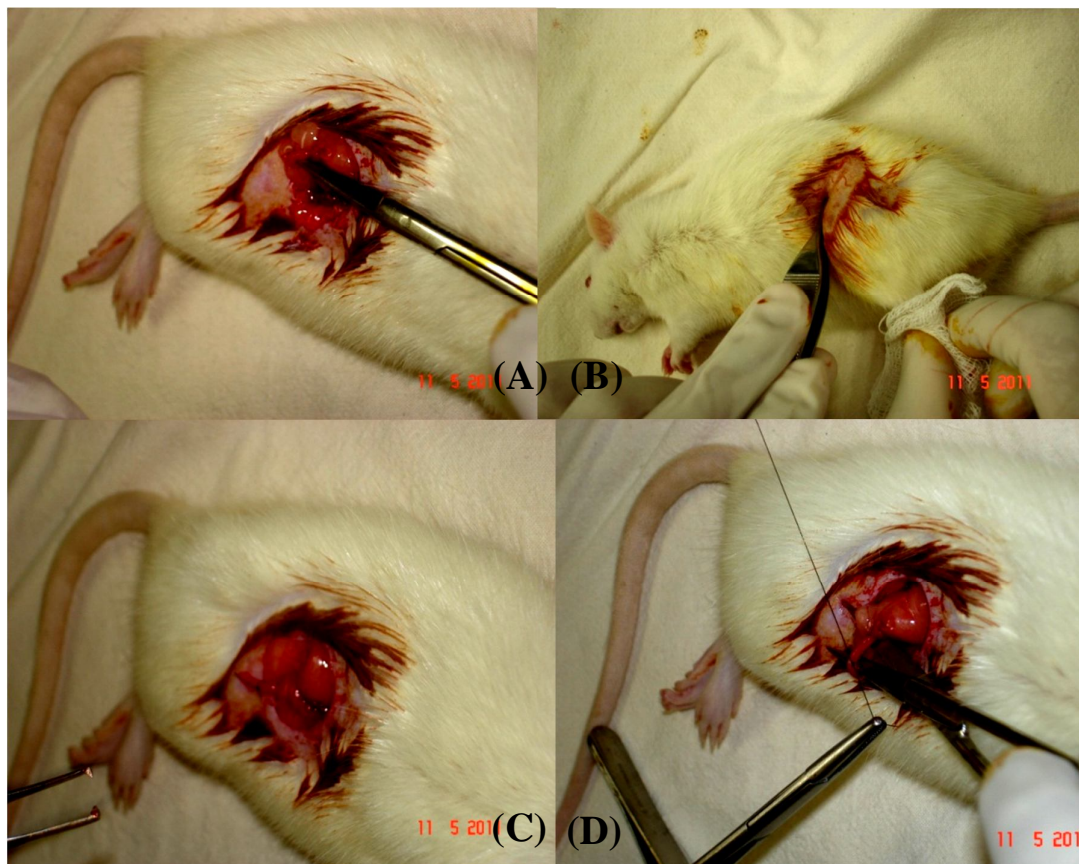


figura
3.
Fotografia
mostra

ndo etapas da cirurgia de ovariectomia. (A) Posição da rata em decúbito dorsal, localizando a área a ser incisada; (B) Exposição da tuba uterina e do Ovário, (C) Ligadura da tuba uterina e (D) região suturada no plano mais profundo.

3.3.3 Comprovação do ciclo estral

As ratas foram submetidas à citologia vaginal esfoliativa, através da inserção de soro fisiológico e posterior aspiração do material, com uso de uma micropipeta (Figura 4). Em seguida, o material aspirado foi espalhado em lâmina e submerso em álcool absoluto para fixação. Posteriormente, o material coletado foi analisado microscopicamente para caracterização do ciclo estral.



Figura 4. Esfregaço vaginal

3.3.4 Craniotomia

A figura 5 mostra o processo de craniotomia. O animal foi posicionado em decúbito ventral sob uma mesa cirúrgica, isolada com campos cirúrgicos estéreis, a área operada foi isolada pelo uso de campos cirúrgicos estéreis, realizou-se uma incisão na pele no plano sagital desde a região occipital até a região frontonasal de aproximadamente 1,0 cm e o tecido divulsionado com tesoura romba, logo após o perióstio foi incisado e descolado com o uso de um sindesmótomo e expondo a calota craniana (Figura 4A). Com o uso de uma broca trefina (Neodent, Brasil), montada em peça reta motor elétrico (Beltec LB-100) a 30 rpm, foi realizado um

defeito circular de 5 mm de diâmetro, sob abundante irrigação com soro fisiológico estéril a 0,9%, tomando o cuidado para não lesar a membrana dura-máter (Figuras 4B,C,D). O defeito foi realizado ao lado esquerdo no osso parietal adjacente a sutura parietal..

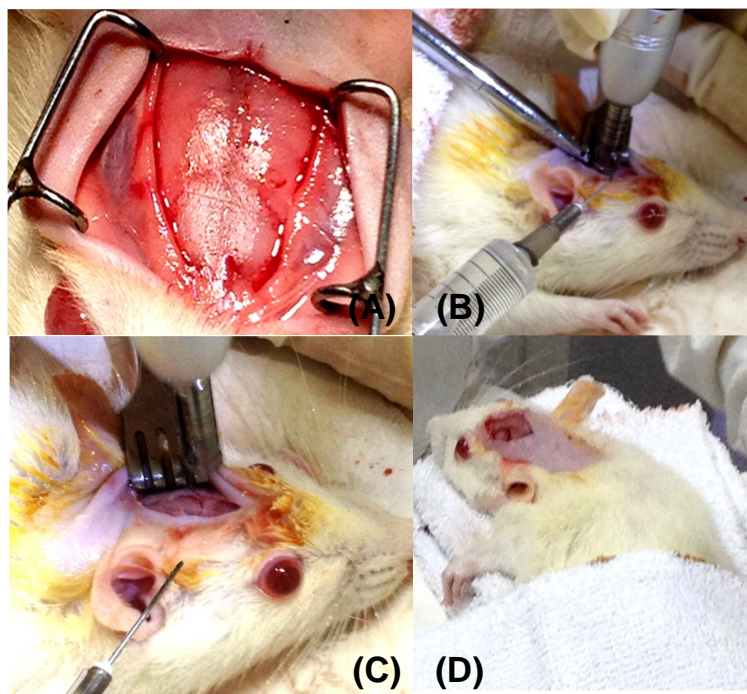


Figura 5. Etapas da Craniotomia (A) Região de calota craniana exposta (B) demarcação da região a ser realizado o defeito com broca trefina 5 mm de diâmetro (C) confecção do realização do defeito (D) Defeito finalizado.

Após a realização do feito, foi realizada a sutura por planos, primeiramente do periósteo sobre o defeito com fio de sutura reabsorvível vicryl 4-0, seguido pela sutura da pele com fio de nylon 4-0.

3.4. Preparo das Peças

A coleta das peças foi realizada com auxílio de um disco de Carborundum acoplado a um micromotor cirúrgico. Subseqüentemente, as peças foram fixadas em formol a 10% por 48 horas para que posteriormente fossem feitas as análises macroscópica, radiográfica e microscópicas.

3.5. Análise Radiográfica

Inicialmente as peças foram envolvidas em lenço de papel para a retirada do excesso de formol. Foi utilizado um equipamento de raios X odontológico CRANEX-D Soredex, Finlândia, com receptor digital de imagem CCD e com tamanho de pixel 96 micrometros, com os seguintes parâmetros: Ponto focal: 0,5 mm, Filtro: 2,7 mm Al; Potencial de operação do tubo p/ Telerradiografia: 66kVp, 10 mA. A análise radiográfica foi avaliada qualitativamente pelo grau de radiopacidade na região do defeito.

3.6. Análise Microscópica

As peças fixadas em formol a 10% por 48 horas em temperatura ambiente e foram descalcificadas usando EDTA18% (ácido etilenodiaminotetracético) e incluídas em parafina. Os cortes seriados microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal, com seis micrômetros de espessura a partir da região central do defeito e corados pelo método da hematoxilina/eosina (H.E.) e Tricômico de Masson.

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 posterior análise cuidadosa de todas as estruturas e tecidos presentes, observando-se principalmente a neoformação óssea.

As imagens panorâmicas foram capturadas com o aumento de 4x e para as capturas das regiões da borda e do centro, o aumento foi de 10x (1x objetiva, 10x ocular), 20x (2x objetiva, 10x ocular) e 40x (4x objetiva, 10x ocular) dependendo da imagem.

3.7. Histomorfometria

A histomorfometria foi realizada utilizando o programa ImageJ (NIH – National Institute of Health). Uma grade foi superposta à fotomicrografia (figura 5) para medida das áreas relativas aos tecidos ósseo e conjuntivo, o tecido em diferenciação foi considerado como tecido conjuntivo.

Foram selecionadas três regiões de cada corte sendo: Região central do defeito e Bordas direita e esquerda do defeito. Foram usadas ampliação de 20x (2x objetiva, 10x ocular). Foi selecionado o corte da região central do defeito.

Para a análise do resultado, foi considerada a proporção de tecido ósseo:

$$\%Tecido\ ósseo = \frac{\text{área do tecido ósseo}}{\text{área total}} * 100$$

Sendo a área total a soma das áreas de todos os tecidos considerados.

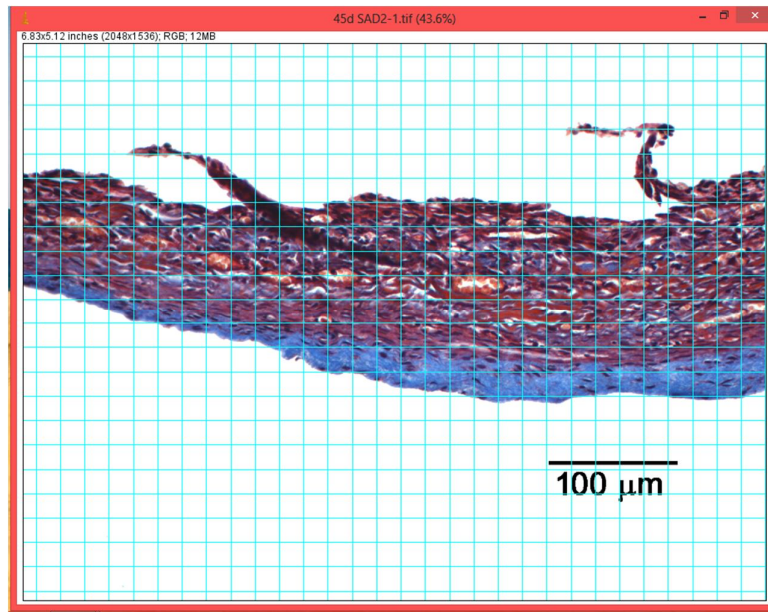


Figura 6. Imagem da tela do programa ImageJ. A grade utilizada foi de 20µm sobre fotomicrografia da região central do defeito.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e após a confirmação da normalidade foram submetidos ao teste *t*-Student. Foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0.05$.

4. Resultados

Os animais foram acompanhados durante o período de preservação e não foram observadas nenhuma alteração incomum, tanto após a ovariectomia como após a craniotomia.

A análise microscópica do esfregaço vaginal realizado antes da craniotomia, comprovou que as ratas encontraram-se na fase diestro do ciclo estral, comprovando o sucesso da ovariectomia.

4.1 Análise Macroscópica

A análise macroscópica das peças removidas não demonstrou nenhum tipo de alteração e sinais de infecção na região do defeito.

4.2 Análise Microscópica.

As figuras de 6 a 11 mostram fotomicrografias das peças coletadas aos 7,15 e 45 dias após a craniotomia no aumento de 4x.

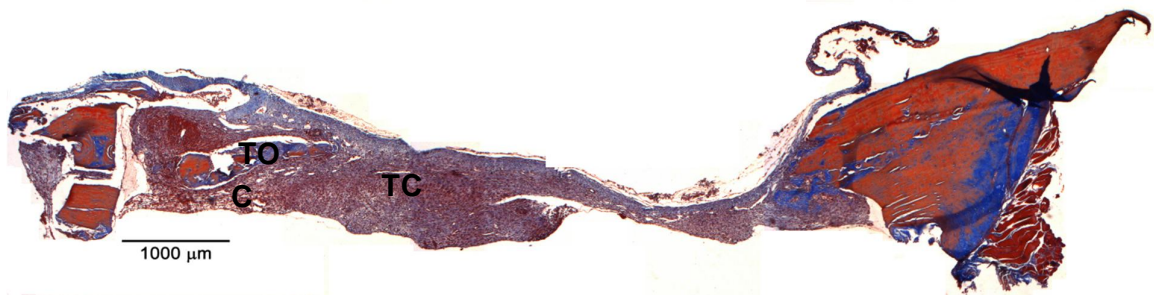


Figura 7. Fotomicrografia do Grupo Ovariectomia (OVX) 7dias. TC: Tecido Conjuntivo, C: Coágulo. Coloração Tricrômico de Masson (4X).

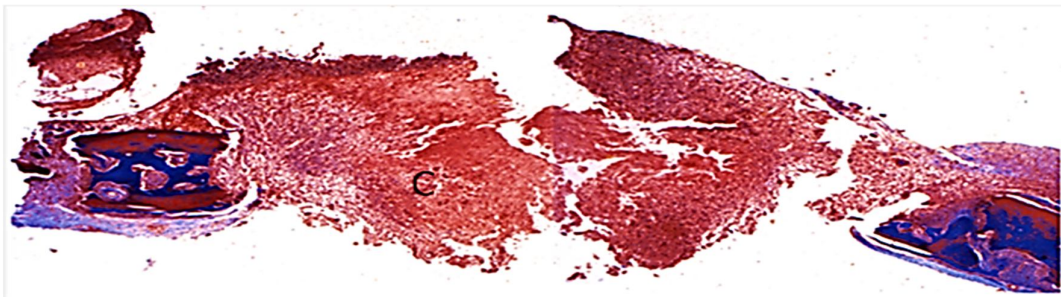


Figura 8. Fotomicrografia do Grupo SHAM 7dias. C: Coágulo. Coloração Tricrômico de Masson (40x).

O grupo SHAM aos 8 dias (figura 8) apresenta somente coágulo na região do defeito, resposta normal devido à recente cirurgia.

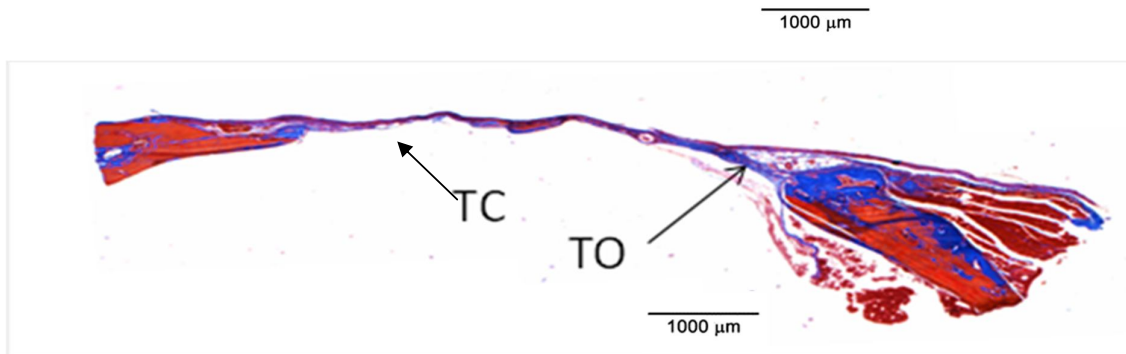
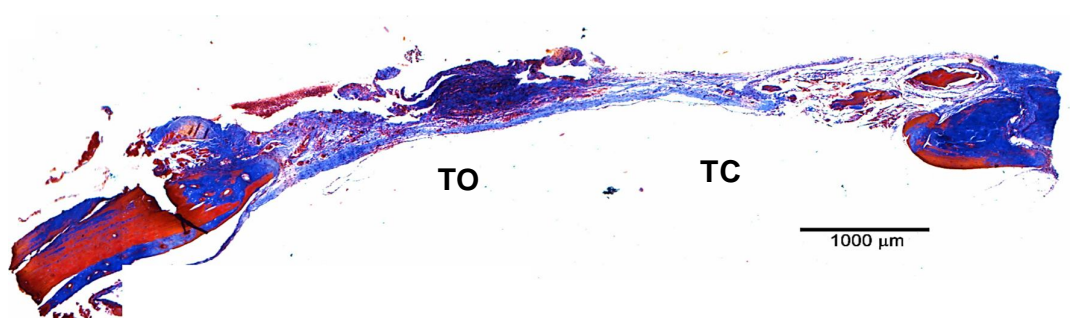


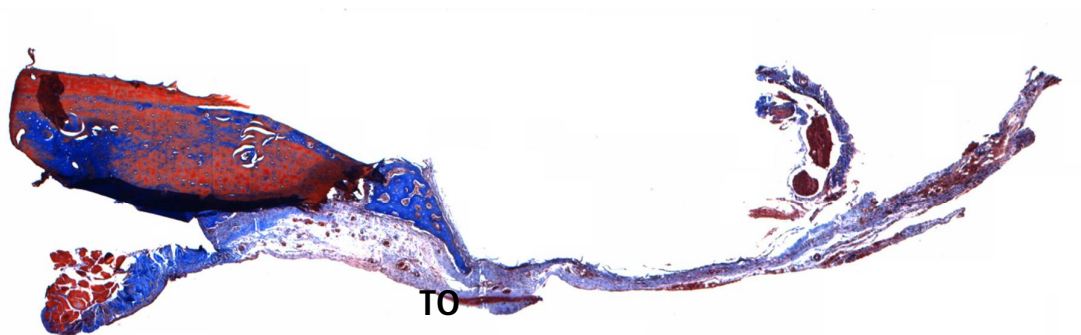
Figura 9. Fotomicrografia do Grupo Ovariectomia (OVX) 15dias. TC: Tecido Conjuntivo, TO Tecido Ósseo Neoformado. Coloração Tricrômico de Masson (4x).



O grupo OVX (Ovariectomizado) aos 15 dias (Figura 9) apresenta uma estreita faixa de tecido conjuntivo na região do defeito e algumas formações ósseas.

Figura 10. Fotomicrografia do Grupo SHAM 15dias. TC: Tecido Conjuntivo, TO Tecido Ósseo Neoformado. Coloração Tricrômico de Masson (4x).

O grupo SHAM aos 15 dias (figura 10) apresenta um processo de formação



óssea avançado em relação ao grupo OVX no mesmo período (figura 9). O tecido conjuntivo (TC) ainda está presente, porém verifica-se tecido ósseo neoformado (TO).

Figura 11. Fotomicrografia do Grupo OVX 45 dias. TO: Tecido ósseo; TC: Tecido conjuntivo. Coloração Tricrômico de Masson (4x)

O grupo OVX aos 45 dias (Figura 11) apresenta áreas ósseas neoformadas (TO) e bastante tecido conjuntivo em diferenciação (TC). A quantidade de tecido conjuntivo (TC) é maior que a quantidade de tecido ósseo neoformado (TO).

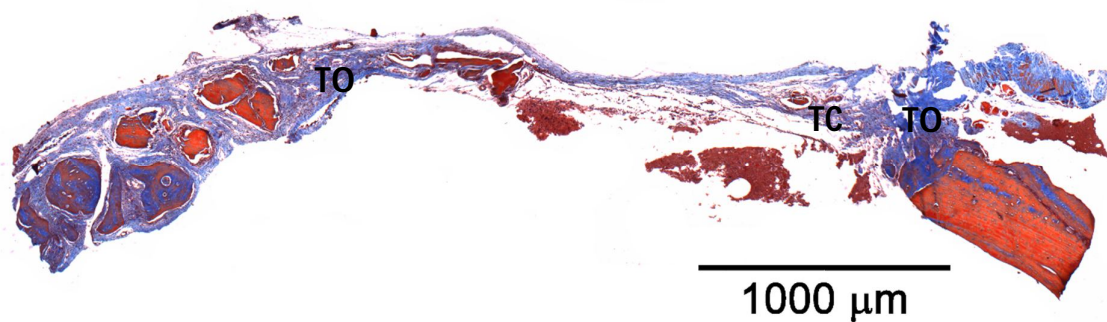
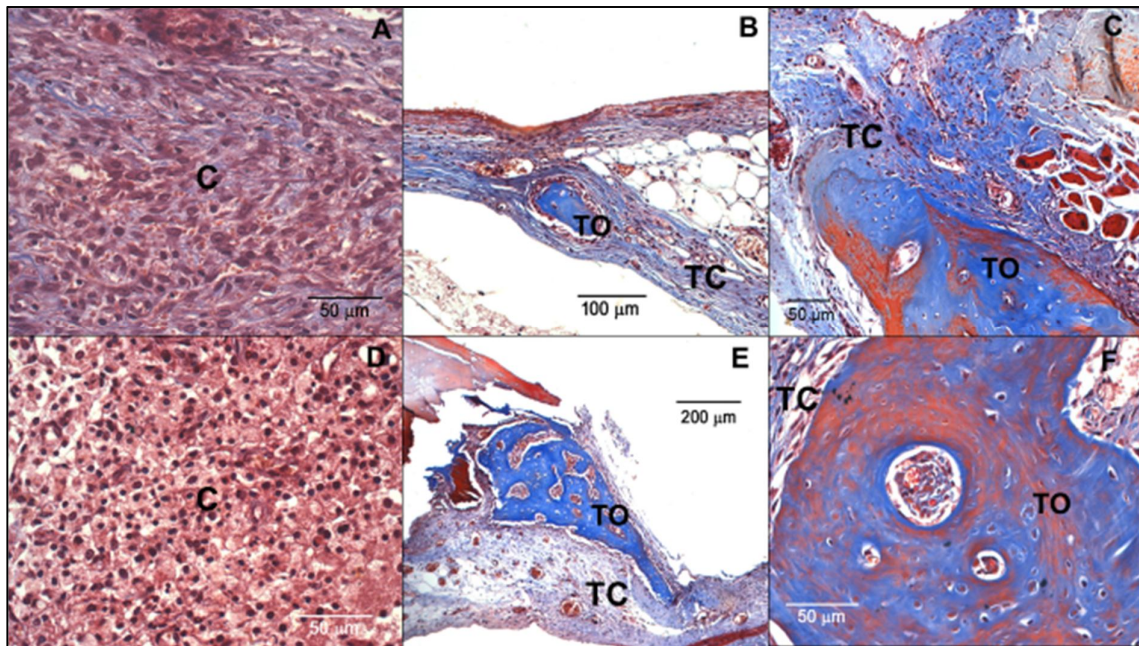


Figura 12. Fotomicrografia do Grupo SHAM 45 dias. TO: Tecido ósseo; TC: Tecido conjuntivo. Coloração Tricrômico de Masson (4x).

O grupo SHAM aos 45 dias (figura 11) obteve um formação óssea bem mais avançada que o grupo OVX no mesmo período (figura 10). Ainda existem áreas de tecido conjuntivo (TC), mas a formação óssea está em grande quantidade na borda do defeito, mostrando que não estabilizou-se somente em uma área mas sim que existem áreas de formação óssea distintas.

A figura 13 ilustra regiões ampliadas de todos os grupos e períodos de



estudo.

Figura 13. Fotomicrografia ampliada dos grupos ovariectomizados e SHAM; (A) OVX 7 dias região central demonstrando coágulo; (B) OVX 15 dias região central mostrando a presença de tecido ósseo neoformado (TO) e áreas com tecido conjuntivo (TC) ; (C) OVX 45 dias na região central mostrando áreas de neoformação óssea (TO) circundadas por tecido conjuntivo (TC); (D) SHAM 7 dias na região central mostrando grande quantidade de coágulo ; (E) SHAM 15 dias na borda esquerda do defeito indicando uma região de neoformação óssea (TO) ; (F) SHAM 45 dias na região central mostrando tecido ósseo (TO) formado indicado pelos osteócitos. Aumento de 20x Coloração Tricômico de Masson. TO – Tecido ósseo; TC – Tecido conjuntivo.

4.3 Análise Radiográfica

A figura 14 mostra as radiografias digitais dos grupos OVX e SHAM aos 7,15 e 45 dias, respectivamente.

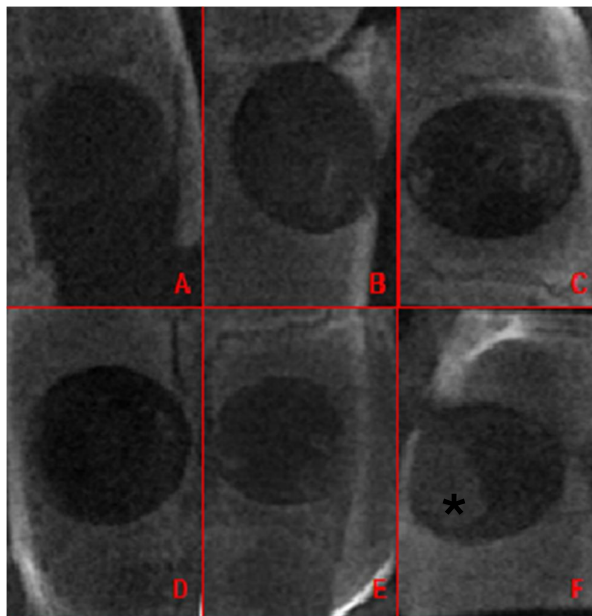
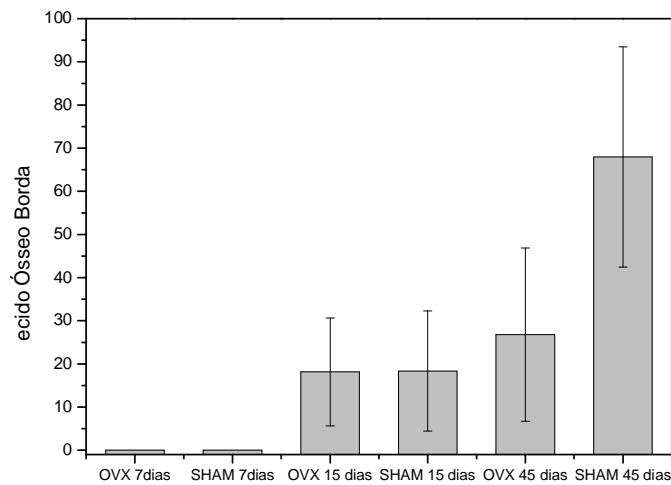


Figura 14. Radiografia (A) grupo OVX 7 dias; (B) grupo OVX 15 dias; (C) grupo OVX 45 dias; (D) grupo SHAM 7 dias; (E) grupo SHAM 15 dias; (F) grupo SHAM 45 dias.

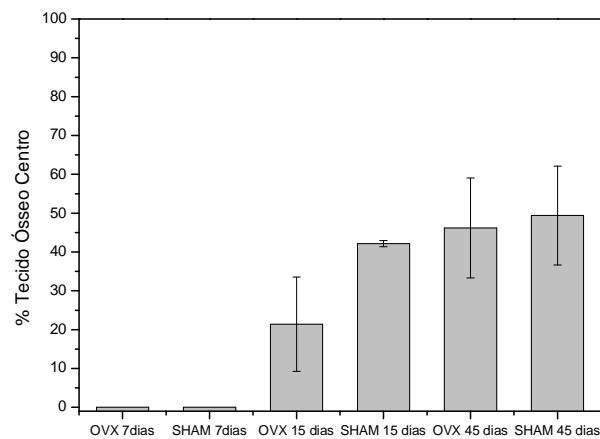
A figuras 14 A e 14 B tratam do período de 7 dias. Portanto em ambas verificou-se no defeito áreas radiolúcidas, ou seja, não apresentou formação de tecido ósseo. As figuras 14 C e 14 D mostram diferenças entre os grupos OVX e SHAM. Na figura 14 C (OVX) na região do defeito verifica-se uma pequena área radiopaca. Na figura 14 D, na borda do defeito, estão presentes áreas de radiopacidade, compatíveis com a neoformação óssea. No período de 45 dias, o grupo SHAM (figura 14 F) apresentou uma área radiopaca na borda do defeito (*) e o grupo OVX (figura 14 E) poucas áreas radiopacas, caracterizando tecido ósseo neoformado em maior quantidade no grupo SHAM aos 45 dias.

4.4 Histomorfometria

As figuras 15A e 15B mostram os resultados da morfometria de tecido ósseo formado na borda e no centro do defeito de acordo com o período e o grupo. Os valores estão representados pela média e pelo desvio padrão.



(A)



(B)

Figura 15. Morfometria do Tecido ósseo neoformado de acordo com o período e grupo de estudo. (A) Borda do defeito (B) centro do defeito. Não há diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos na comparação entre os resultados dos grupos SHAM e OVX.

5. Discussão

Existe uma relação bem definida entre a deficiência dos hormônios sexuais e a biologia óssea, uma vez que os estrógenos e andrógenos são necessários no processo de formação, maturação e remodelação óssea; existindo receptores desses hormônios nos osteoblastos, sendo estes essenciais no desenvolvimento do esqueleto (FALONI, CERRI, 2007; FOLWARCZNA et al., 2007). Os eventos biológicos que estão envolvidos no processo de reparação óssea são afetados por diversos fatores, incluindo a osteoporose. A osteoporose retarda o processo e o seu completo entendimento é grande importância clínica. Muitos estudos focados nesse tema são conduzidos em modelo animal de ratas ovariectomizadas, caracterizado também pelo FDA, que mimetiza a condição pós-menopausa, induzindo o desbalanceamento no *turnover* ósseo, fazendo com que a reabsorção óssea exceda a formação óssea levando à desmineralização (THOMPSON 1995;KODAMA et al., 2004; EJIRI et al., 2006; LELOVAS et al, 2008; GIRO et al., 2011).

Este estudo foi realizado em defeitos criados na calota craniana de ratas ovariectomizadas, desde que sua constituição óssea(intramembranosa) é a mesma da maxila e da mandíbula, aproximando-se de situações presentes em cirurgias odontológicas. O estudo realizado por DURAO et al., 2014 no mesmo modelo animal adotado nesse trabalho em que as ratas sofreram ovariectomia e após dois meses foi realizado um defeito crítico na calota craniana, mostrou que o processo de regeneração óssea ocorre mais lentamente no grupo OVX do que no grupo SHAM. Devido a similaridade entre osteoporose no modelo animal e no humano após a menopausa,os autores afirmam que é relevante a importância dessa implicação clínica no processo de regeneração óssea.

O presente estudo mostrou que há influência da supressão hormonal no processo de reparação óssea de defeitos criados na calota craniana. A análise microscópica ao longo dos períodos de estudo mostra o progresso da reparação óssea, desde que foi observada a presença do coágulo e formação de tecido conjuntivo aos 7 dias após a cirurgia, evoluindo para a neoformação óssea. Os resultados mostram que a reparação óssea encontra-se em estágio mais avançado no grupo SHAM aos 45 dias (Figura 12 e 13 F), onde pode-se notar a presença de tecido ósseo neoformado em maior quantidade, especialmente na borda do defeito, do que no grupo OVX (Figura 11 e 13 C). As imagens radiográficas corroboram com

esse resultado, uma vez que é possível notar maiores quantidades de áreas radiopacas nas proximidades da borda do defeito no grupo SHAM 45 dias. (Figura 14F). A Histomorfometria do tecido ósseo formado na região indicam que o grupo SHAM apresenta um processo de reparo ósseo mais rápido que o grupo OVX, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$ t-Student) (15 A e 15 B).

Outros trabalhos conduzidos em modelo animal para estudo da influência da osteoporose na reparação óssea indicam resultados controversos (YINGIE et al., 2007). Namkung-Matthai e colaboradores (2001) encontraram que a osteoporose influencia nos estágios iniciais da cicatrização de fraturas, enquanto que Kubo e colaboradores (1999) mostraram o oposto, que a osteoporose influencia os estágios finais da cicatrização. Por outro lado, Cao e colaboradores (2002) relatam uma aceleração no processo de cicatrização devido a remodelação acelerada do calo ósseo formado. Embora esses estudos citados tenham sido realizados em outra região do esqueleto (fêmur), diferindo do presente trabalho cujo defeito foi realizado na calota craniana, de diferente constituição, todos indicam uma interferência da osteoporose no processo de cicatrização de fraturas. Mais recentemente Fuegl e colaboradores (2011) estudaram a influência da ovariectomia e hiperglicemia na consolidação de enxertos na calota craniana de ratas. Similarmente aos nossos resultados quantitativos não encontraram diferenças estatísticas significantes devido às interfeências sistêmicas induzidas. Os autores atribuem esse resultado à fraca capacidade osteogênica do osso da calvária.

Com isso, apesar de ser possível observar qualitativamente diferenças na reparação óssea entre os grupos OVX e SHAM, dentro das limitações desse trabalho, não foram encontradas diferenças na quantidade de tecido ósseo formado no defeito criado na calota craniana. Porém, tendo em vista a possibilidade de alterações no modelo, como prolongamento do experimento a fim de simular efeitos mais tardios da osteoporose, futuras investigações acerca do assunto são possíveis e de grande interesse.

Referências

1. ASAGIRI, M., TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**. V.40, p.251-264, 2007.
2. BEHONICK, D. J., XING, Z., LIEU, S., BUCKLEY, J. M., LOTZ, J. C., MARCUCIO, R. S., COLNOT, C. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. **PLoS One**. v.2, n.11, 2007.
3. BRUZZANITI, A., BARON, R. Molecular regulation of osteoclast activity. **Rev Endocr Metab Disord**. v.7, p. 123-139, 2006.
4. CAO, Y., MORI, S., MASHIBA, T., WESTMORE, M. S., MA, L., SATO, M., NORIMATSU, H. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.17, n.12, p.2237-2246, 2002.
5. CEBRIAN, A.M., SANTOS, L.L.M., ARAUJO, E.L.A. Osteoporose: características, prevenção e tratamento. **Arq Apader**. v.9 n.2, p.14-19, 2005.
6. DUBNOV, G., BRZEZINSKI, A., BERRY, EM. Weight control and management of obesity after menopause: the role of psysical activity. **Maturitas**. v.44, n.2, p.98-101, 2003.
7. DURAO, F.F., GOMES, P.D., COLACO, B.J. The biomaterial mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. **Osteoporosis international**. V. 25, n.4, p. 1535-1545, 2014.
8. ECKEL, LA., GEARY, N. Estradiol treatment increases feeding-induced c-Fos expression. In the brains of ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.281, n.3, p.738-746, 2001.
9. EJIRI, S., TOYOOKA, E., TANAKA, M., ANWAR, R.B., KOHNO, S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. **Archives of Oral Biology**. v. 51, n. 11, p. 941-50, 2006.
10. FALONI, APS., CERRI, PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea. **Rev Odontol UNESP**. v.36, n.2, p.181-188, 2007.

11. FOLWARCZNA, J., SLIWINSKI, L., CEGIELA, U., PYTIC, M., KACZMARCZYK- SEDLAK, I., NOWIŃSKA, B. Raloxifene similarly affects the skeletal system of male and ovariectomized female rats. **Pharmacological Reports**. v.59, 2007.
12. FUEGL, A., TANGL, S., KEIBL, C., WATZEK, G., REDL, H., GRUBER, R. The impact of ovariectomy and hyperglycemia on graft consolidation in rat calvaria. **Clinical Oral Implants Research**. v.22, n.5, p. 524-529, 2011.
13. GERY, N., ASARIAN, L. Estradiol increases glucagon's satiety potency in ovariectomized rats. **Am J Regul Integr Comp Physiol**. v.281, n.4, p.1290-1294, 2001.
14. GIRO, G., GONÇALVES, D., SAKAKURA, C. E., PEREIRA, R. M. R., MARCANTONIO JÚNIOR, E., ORRICO, S. R. P. Influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 69, n. 7, p. 1911-8, 2011.
15. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Guanabara Koogan. p.147-160, 2004.
16. KAZANAVICIUS, G., PAVILIONYTE, S., SAPOKAITE, G., KAZANAVICIENE, V. The analysis of the changes in mineral bone density in different age groups of females in dual energy roentgenological absorptiometry studies of the spine and ultrasound of humerus. **Endocrinology in Lithuania**, 2003.
17. KODAMA, I., NIIDA, S., SANADA, M., YOSHIKO, Y., TSUDA, M., MAEDA, N., OHAMA, K. Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in ovariectomized mice. **Journal of Bone Mineral Research**. v.19, n. 2, p. 200-6, 2004.
18. KUBO, T., SHIGA, T., HASHIMOTO, J., YOSHIOKA, M., HONJO, H., URABE, M.; HIRASAWA, Y. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**. v.68, n.5, p.197-202, 1999.
19. LELOVAS, P.P., XANTHOS, T. T., THOMA, S. E., LYRITIS, G. P., DONTAS, I. A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative Medicine**. v. 58, n. 5, p. 424-30. 2008.
20. LUZIVITO, E.R., DIAS, S.S.M.D., OKAMOTO, T., DORNELLES, R.C.M., OKAMOTO, R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the

- alveolar healing process in rats. **Archives of Oral Biology**. v.56, n.10, p. 984-990, 2011.
21. MACLEAN, C. Systematic review: comparative of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis. **Ann Inter Med**. v.148, n.3, p.197-213, 2008.
 22. NAM, SO. HEE., JEONG, JAE-HWAN., CHE, XIANGGUO., LIM, KYUNG-EUN., NAM, HYEMI., PARK, JONG-SANG., CHOI, JE-YONG. Topically administered Risedronate shows powerful anti-osteoporosis effect in ovariectomized mouse model. **Bone**. v.50, n.1, p.149-155, 2012.
 23. NANJI, A. Ten cate's Oral Histology: **Development, Structure, and function**. Philadelphia, USA: Elsevier, 2008. 411p.
 24. NAMKUNG-MATTHAI, H., APPLEYARD, R., JANSEN, J., HAO LIN, J., MAASTRICHT, S., SWAIN, M., DIAMOND, T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**. v. 28, n.1, p.80-86, 2001.
 25. PATEL, SH., MURPHY, KP. Fractures of the proximal femur correlates of radiological evidence of osteoporosis. **Skeletal radiol**. v.35, n.4, p.202-211, 2006.
 26. RODAN, G.A., MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**. v. 289, p. 1508-14, 2000.
 27. SHAW, J.M., WITZKE, K.A. Exercise for Skeletal Health and Osteoporosis Prevention. *In*: ACSM'S RESOURCE. **Manual for guidelines for exercise testing and prescription**, 3.ed. Baltimore : Willians and Wilkins, 1998. p.288-239.
 28. SIRIS, ES., BRENNEMAN, SK., BARRET-CONNOR, E., MILLER, PD., SAJJAN, S., BERGER, ML. The effect of age and bone mineral density on the absolute, excess, and relative risk of fracture in postmenopausal women age 50-99: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. **Osteoporosis Int**. v.17, n.4, p.565-574, 2006.
 29. 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.
 30. ULRICH, C.M., GEORGIO, C.C., SNOW-HARTER, C.M., GILLIS, D.E. Bone mineral density in mother--daughter pairs: Relations to lifetime exercise,

lifetime milk consumption, and calcium supplements. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.63, p.72-79, 1996.

31. 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.
32. YINGJIE, H., GE, Z., YISHENG, W., LING, Q., HUNG W. Y., KWOKSUI L., FUXING, P. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. **Bone**. v.41, n.4, p.631-638, 2007.

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA – UNIMAR

Comitê de Ética em Uso Animal

**COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA -
SP
CEUA - UNIMAR
RESOLUÇÃO**

O Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade de Marília (CEUA – UNIMAR) analisou o Projeto de Pesquisa com protocolo n.62, intitulado:

“ HISTOMORFOMETRIA E ANÁLISE RADIOGRÁFICA COMPARATIVA DE DO REPARO ÓSSEO EM RATAS NORMAIS E OVARIECTOMIZADAS “

Projeto do CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. ANGELA KINOSHITA

Este Projeto de Pesquisa foi enquadrado

APROVADO

Marília, 10 DE DEZEMBRO 2012

Dra. Patricia Cincotto dos Santos Bueno
Coordenador do CEUA – UNIMAR