

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

BRUNO OLIVER PIERIM

**HISTOMORFOMETRIA E ANÁLISE
RADIOGRÁFICA COMPARATIVA DE VÉRTEBRAS
DE RATAS NORMAIS, OVARIECTOMIZADAS
NÃO TRATADAS E TRATADAS COM
ALENDRONATO DE SÓDIO**

BAURU

2014

BRUNO OLIVER PIERIM

**HISTOMORFOMETRIA E ANÁLISE
RADIOGRÁFICA COMPARATIVA DE VÉRTEBRAS
DE RATAS NORMAIS, OVARIECTOMIZADAS
NÃO TRATADAS E TRATADAS COM
ALENDRONATO DE SÓDIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia sob orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

BAURU

2014

Pierim, Bruno Oliver.

P618h

Histomorfometria e análise radiográfica comparativa de vértebras de ratas normais, ovariectomizadas não tratadas e tratadas com alendronato de sódio / Bruno Oliver Pierim -- 2014.

30f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

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

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

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que o estudante Bruno Oliver Pierim, apresentou na forma de Comunicação Oral e Impressa o Trabalho de Conclusão de Curso "Histomorfometria e análise radiográfica comparativa de vertebras de ratas normais, ovariectomizadas não tratadas e tratadas com alendronato de sódio.", como requisito para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

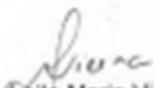
Membros da Banca Examinadora:

Dra. Angela Milie Otta Kinoshita (Orientadora)

Dra. Regina Magrini Guedes de Azevedo

Ms. Leonardo Marques

Bauru, 4 de novembro de 2014.


Dra. Etila Maria Vieira

Diretora do Centro de Ciências da Saúde

Agradecimentos:

Agradeço aos meus pais que junto comigo me ajudaram a vencer e concluir a minha faculdade . E agradeço também, em especial a minha orientadora Angela Mitie Otta Kinoshita, que sempre me ajudou. Com muita disposição, prestativa, muito inteligente, transmitindo seus conhecimentos, para o sucesso, e realização do meu Trabalho de conclusão de curso. Muito obrigado pela oportunidade de ser seu orientado!

Resumo

A supressão hormonal biológica, também chamada de menopausa, é decorrente da perda definitiva das funções primárias dos ovários. Pode-se induzir esse processo cirurgicamente, num procedimento denominado de ovariectomia. A falta de estrogênio acarreta falha osteoblástica, ou seja, na formação do osso conduzindo a uma perda significativa de substâncias ósseas, causando uma perda de minerais (desmineralização). O estudo das consequências da supressão hormonal no tecido ósseo é de grande importância clínica e pode ser reproduzida 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. Uma das regiões mais afetadas por fraturas na osteoporose é a região das vértebras e é objeto de estudo desse trabalho. Foram utilizadas 54 ratas, divididas em 3 grupos experimentais, OVX/NaCl, SHAM e OVX/ALD. Os grupos OVX/NaCl e OVX/ALD sofreram ovariectomia bilateral e o grupo SHAM sofreu o mesmo tratamento cirúrgico sem remoção dos ovários. Após 60 dias da cirurgia, os grupos OVX/NaCl e SHAM foram tratados com NaCl e o grupo OVX/ALD com Alendronato de Sódio, por via oral e esse tratamento se estendeu até a data da eutanásia programada. Após 30, 45, 75 dias do tratamento, 6 animais de cada grupo foram eutanasiados e as vértebras removidas para as análises. Nas imagens microscópicas é possível notar os efeitos da ovariectomia, com perda progressiva de tecido ósseo. A análise morfométrica confirma os achados microscópicos, onde volume relativo das trabéculas ósseas no grupo OVX/NaCl é menor que nos demais grupos ($p < 0.05$). Adicionalmente, notou-se o efeito positivo do tratamento com Alendronato de Sódio desde que os resultados do grupo OVX/ALD são os mesmos do grupo SHAM.

Palavras Chaves (DECS): Osteoporose. Ovariectomia. Vértebra.

Abstract

The biological hormonal suppression, known as menopause is due to the permanent loss of the primary functions of the ovaries. This process can be surgically induced through a procedure of ovariectomy. The lack of estrogen leads to osteoblastic failure in bone formation leading to a significant loss of bone substance, causing demineralization. The study of the consequences of hormonal suppression in bone tissue 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. This is primarily due to the imbalance in bone turnover, where bone resorption exceeds bone formation leading to demineralization. One of the regions most affected by osteoporosis is fractures in the region of the vertebrae and this is the object of study of this study. Fifty four rats were used, divided into three experimental groups, OVX / NaCl , SHAM and OVX / ALD. OVX groups underwent bilateral ovariectomy and SHAM group underwent the same surgical treatment without removal of the ovaries. After 60 days post-surgery, OVX/NaCl and SHAM groups were orally treated with NaCl and OVX / ALD with Alendronate Sodium. These treatments continued until the date of the scheduled euthanasia. After 30, 45, and 75 days of treatment, 6 animals from each group were euthanized and vertebrae were removed for analysis. In microscopic images it is possible to notice the effects of ovariectomy, with progressive loss of bone tissue. The morphometric analysis confirms the microscopic findings, since the relative volume of the trabecular bone in the OVX/NaCl group is lower than the other groups ($p < 0,05$) . Additionally, it was noted the positive effect of treatment with Alendronate Sodium since the results of the group OVX / ALD are the same SHAM group.

Key Words (DECS): Osteoporosis. Ovariectomy. Vertebrae.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Local e grupos de estudo	15
3.2 Delineamento experimental	15
3.3 Procedimentos cirúrgicos	16
3.3.1 Anestesia e antisepsia	16
3.3.2 Técnica cirúrgica-ovariectomia	16
3.4 Preparo das peças	17
3.5 Análise radiográfica	18
3.6 Análise microscópica	19
4 RESULTADOS	20
4.1 Análise macroscópica	20
4.2 Análise radiográfica	21
4.3 Análise microscópica	23
5 DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	28
7 REFERÊNCIAS	29
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	32

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é definida como uma “doença” silenciosa e progressiva”, pela Associação Nacional contra a Osteoporose (APOROS, 2012).

Ela é caracterizada pelo desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, causando deterioração progressiva do microesqueleto e diminuição da massa óssea de vários ossos, principalmente dos fêmures e vértebras, levando à diminuição da resistência e a um maior risco de fraturas nos ossos (SZEJNFELD, 2000)

Há um conjunto de fatores e determinados hábitos, que influenciam e favorecem o desenvolvimento da Osteoporose. Uma delas é a menopausa. Com a idade a mulher tem a menstruação interrompida, ocorre diminuição dos níveis de estrógeno (hormônio feminino), que é fundamental para manter a massa óssea. O segundo é o Envelhecimento: a perda de massa óssea aumenta com a idade. A hereditariedade: a Osteoporose é mais frequente em pessoas com antecedentes familiares da doença (WENDER, 2004)

Dieta pobre em cálcio: o cálcio é fundamental na formação óssea. Por isso é indispensável. Sua obtenção vem partir de alimentos, se a dieta é pobre em cálcio, as chances aumentam do indivíduo obter essa doença. Por isso os alimentos ricos em cálcio são imprescindíveis para prevenir a Osteoporose. Excesso de fumo e álcool: observa-se maior incidência de Osteoporose entre as pessoas que consomem álcool e fumo em excesso (WENDER, 2004).

Imobilização prolongada: o exercício físico constitui um importante estímulo para a formação e o fortalecimento dos ossos. Grandes períodos de imobilização e a falta de exercícios podem levar à Osteoporose (WENDER, 2004).

O alendronato de sódio, é um bifosfonato muito utilizado no tratamento da osteoporose, por diminuir a atividade osteoclastica, estimulando a apoptose dessas células, aumentando a densidade mineral óssea. Esse tipo de medicamento é bastante utilizado por senhoras no período pós-menopausa, onde os níveis de estrógeno são menores, levando a reabsorção óssea. O

medicamento inibe a reabsorção óssea, se o paciente fizer uso-dependente do medicamento. (HWANG&WANG, 2006)

Os bifosfonatos tornaram-se, na última década o melhor tratamento na prevenção da osteoporose. Esses medicamentos são utilizados, para o tratamento e prevenção, evitando a perda de tecido ósseo mineralizado. (FISHER A, 2010)

Os bifosfonatos são eficazes na redução da perda óssea, porque reduzem a reabsorção de tecido ósseo, e promovem a apoptose dos osteoclastos, e estimulam a atividade osteoblástica. Com a diminuição da atividade osteoclastica, é inibido a liberação de fatores de crescimento como TGF- β e IGF-I e de outros peptídeos da matriz óssea, levando a perda de tecido ósseo. (VEGGER JB, 2014)

Medicamentos: Uso de medicamentos, como os corticóides, em tratamentos de longa duração, favorecem a redução da massa. E aumentam as chances de desenvolvimento da doença (WENDER, 2004).

Em tratamento prolongado com corticóides, essa doença pode não provocar sintomas. A dor pode acontecer em consequência de fraturas, que pode ocorrer espontaneamente, principalmente em coluna, quadril e punho. O osso fica tão fraco que pode haver achatamento da vértebra. Pode ocorrer encurvamento da coluna (“corcunda”) e diminuição da altura (GALI, 2001).

A remodelação óssea é definida como um processo de aposição no qual há remoção localizada do osso antigo (reabsorção) e substituição por osso recentemente formado. Esse evento continua por toda a vida adulta do indivíduo, sendo responsável pela renovação do esqueleto e mantendo sua integridade anatômica e estrutura (BROWN, 2002). É um processo fisiológico constante no qual a formação óssea é correspondente à reabsorção, sendo regulada por diversos fatores, como mecanismos regulatórios intracelulares, influência hormonal, fatores locais e externos. Alterações nesse processo podem resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose (NAJJAR, 1977).

O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos (FROST, 1991).

O sinal que inicia a remodelação não está completamente identificado, mas é evidente que forças mecânicas podem ser capazes de alterar a arquitetura óssea local. O primeiro estágio da remodelação envolve o recrutamento das células precursoras de osteoclasto para o osso. Essas, presentes em tecidos hematopoéticos, como na medula óssea, respondem a sinais físicos e hormonais, e, concentrando sobre determinada região da superfície óssea que será reabsorvida, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados. O próximo passo consiste no reconhecimento das proteínas da matriz óssea extracelular por meio de proteínas de membrana celular chamadas integrinas (JUNQUEIRA, 2008). A seguir são formadas a borda vilosa e as zonas claras, essas livres de organelas e ricas em filamentos de actina. Através das zonas claras são formadas poderosas adesões focais, responsáveis pela forte interação célula/substrato e pelo isolamento do espaço externo abaixo da célula (lacuna de reabsorção), onde a borda vilosa se espalha na superfície óssea (BOYDE, 1984).

A ativação osteoclástica é o terceiro evento, provavelmente iniciado pelos fatores liberados pelos osteoblastos e por meio também de contato célula a célula. Em seguida, em fase de reabsorção, os osteoclastos ativados degradam tanto os componentes minerais quanto os orgânicos, pela secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e de colágeno. Os osteoclastos são estimulados por calcitriol, paratormônio (PTH), TNF, prostaglandina E2, além das IL-1, 11 e 6, e são inibidos por IL-4 e 13. O que encerra essa fase pode ser um elevado nível de cálcio local ou substâncias liberadas pela própria matriz (BOYDE, 1984).

O osso é uma fonte rica em fatores de crescimento, importantes na regulação do processo de remodelação óssea. Os osteoclastos, além de sua função osteolítica, desempenham importante papel no desenvolvimento e

crescimento ósseos, ao liberar esses fatores da matriz extracelular mineralizada. Tais fatores estimulam os osteoblastos a se proliferarem e a sintetizar proteínas da matriz. Em seguida, ao completarem o ciclo da reabsorção, secretam proteínas que servirão de substrato para a fixação do osteoblasto. Os osteoclastos sofrem apoptose, possivelmente induzida pelo fator de crescimento transformante beta (TGFbeta), responsável também pelo bloqueio da reabsorção óssea e pela atração dos osteoblastos. Ao contrário do TGF-beta, o PTH e a 1,25(OH)2D3 inibem a apoptose in vitro do osteoclasto (BOYDE, 1984).

A supressão hormonal biológica, também chamada de menopausa, é decorrente da perda definitiva das funções primárias dos ovários. Pode-se induzir esse processo cirurgicamente, cujo procedimento é denominado de ovariectomia. A falta de estrogênio causada pela ovariectomia acarreta falha osteoblástica, ou seja a formação do osso, conduzindo, a uma perda significativa de substâncias ósseas, causando uma perda de minerais (desmineralização). Sendo assim, a retirada dos ovários causa uma desmineralização dos ossos, provocando a osteoporose (TANAKA, 1998).

A osteoporose pós-menopausa afeta principalmente mulheres com idades compreendidas entre os 50 e os 70 anos e está relacionada com a deficiência de estrogênios (ADLER, 2012).

Um dos modelos animais mais utilizados em estudos relacionados à desmineralização devido à supressão hormonal é de ovariectomia em ratas. Este modelo mimetiza a condição pós-menopausa de mulheres, pois os mecanismos que ocorrem nas ratas ovariectomizadas é o mesmo que ocorre em humanos e deve-se, principalmente, ao desbalanceamento no processo de remodelação óssea, ou seja, onde a reabsorção óssea excede a formação óssea levando à desmineralização. Dessa forma, esse modelo é apropriado para estudos relacionados à osteoporose, principalmente na região da tíbia, fêmur e vértebras (THOMPSON, 1995). Após três meses das ovariectomias é considerado suficiente para que ocorra uma significativa perda de massa óssea. (HERNANDES L, 2012)

Existem algumas formas de tratamento da osteoporose com enfoque curativo e/ou preventivo. A terapia com os bifosfonatos auxilia na preservação da integridade da estrutura óssea, mas pode ocasionar alguns efeitos colaterais principalmente nos tratamentos de longa duração. Por isso, faz-se necessário a busca por outros tratamentos que além de serem efetivos, minimizem os efeitos adversos e sejam acessíveis à população. A homeopatia é uma alternativa interessante, porém, há poucos estudos científicos sobre os efeitos de medicamentos homeopáticos no tratamento da osteoporose. Portanto, esse projeto consiste da caracterização radiológica e microscópica comparativa de ratas ovariectomizadas, não ovariectomizadas, e ovariectomizadas e tratadas com Alendronato de sódio, utilizando a vértebra como região de estudo (JUNQUEIRA, 2008) .

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar através da histomorfometria e da radiografia a influência do Alendronato de Sódio na mineralização da região das vértebras L1-L2 em ratas ovariectomizadas, através da comparação com o grupo de ratas ovariectomizadas não tratadas e com ratas normais.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar, através da histomorfometria e da radiografia, o perfil de mineralização da região das vértebras L1-L2 de ratas ovariectomizadas e tratadas com Alendronato de Sódio.
- Estudar, através da histomorfometria e da radiografia, o perfil de mineralização da região das vértebras L1-L2 de ratas ovariectomizadas e não tratadas.
- Estudar, através da histomorfometria e da radiografia, o perfil de mineralização da região das vértebras L1-L2 de ratas normais.
- Avaliar o efeito do Alendronato de Sódio na mineralização da região das vértebras L1-L2 de ratas ovariectomizadas em comparação com ratas ovariectomizadas não tratadas e com ratas normais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3 Local e grupos de estudo

Foram utilizadas neste estudo 54 ratas (*rattusnovergicus*, *Wistar*), adultas, com 3 meses de idade e massa média de 250g 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 3 grupos experimentais de 18 animais cada, descritos a seguir:

1. OVX/ALD – Submetidos ovariectomia e foram tratadas com Alendronato (0,50mg/semana)
2. OVX/NaCl - Submetidos ovariectomia e foram tratadas com NaCl
3. SHAM/NaCl – Submetidos o mesmo tratamento cirúrgico sem a remoção dos ovários e foram tratadas com NaCl

2.4 Delineamento experimental

As ratas dos grupos OVX foram ovariectomizadas e os animais do grupo SHAM foram submetidos a mesma cirurgia sem a remoção dos ovários. Após 60 dias, todos os animais foram tratados com a droga respectiva ao grupo, por via oral, através de gavagem, e esse tratamento se estendeu até a data da eutanásia programada. Após 30, 45, 75 dias do tratamento, 6 animais de cada grupo foram eutanasiados com dose letal de anestésico geral.

Procedimentos cirúrgicos

3.3.1 Anestesia e antissepsia

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à sedação profunda com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intramuscular (IM) de cloridrato de xilazina (Anasedan®-Vetbrands, Brasil), seguido pela administração intramuscular de anestésico associados de cloridrato de Ketamina (Dopalen® – Vetbrands, Brasil) 87mg/kg de peso corpóreo.

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

3.3.2 Técnica cirúrgica-ovariectomia

As ovariectomias bilaterais foram realizadas com incisões em ambos os flancos, exposição dos ovários e remoção cirúrgica dos mesmos. 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 retornando-os intactos para a posição original e foram realizadas 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.

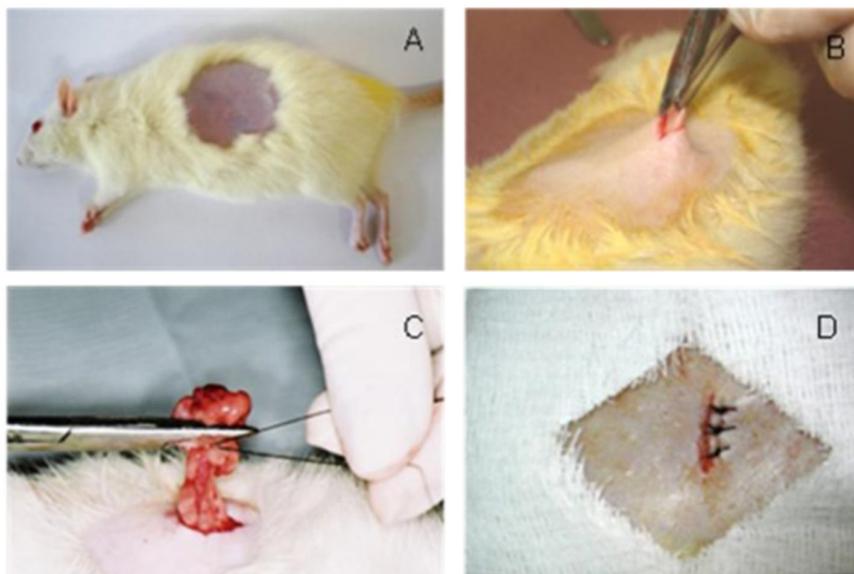


Figura 2 – Técnica de ovariectomia: A) Animal em decúbito lateral anestesiado após a realização da tricotomia; B) Procedimento de incisão; C) Exposição e remoção dos ovários; D) Procedimento finalizado após sutura.

3.4Preparo das peças

Decorrido os períodos de observação de 30, 45 e 75 dias os animais foram submetidos à eutanásia por administração IP de Barbitúricos na dose de 150,0mg/kg de peso animal associado a lidocaína 10mg/ml ao tiopental e as vértebras retiradas. Para tal procedimento foi realizada a tricotomia da parte posterior inferior do animal, próximo à cauda, onde se localizam as vértebras lombares (L1 e L2). Posteriormente demarcou-se com a lâmina de bisturi a localização das vértebras lombares a serem retiradas (figuras 1 e 2).Subsequentemente, as peças foram fixadas em formol a 10% por 48 horas, e posteriormente foram feitas as análises macroscópica, radiográfica e microscópica.



Figura 3- Fotografia do animal eutanasiado em decúbito dorsal mostrando as vértebras L1 e L2 (seta) utilizadas no estudo.



Figura 4 -Remoção de L1 e L2 com o uso da tesoura, bisturi e pinça clínica.

2.5 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.

3.6 Análise microscópica

As peças fixadas em formol a 10% por 48 horas foram descalcificadas usando EDTA18% (ácido etilenodiaminotetracético) e incluídas em parafina. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal, com seis micrômetros de espessura 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.

A Histomorfometria foi realizada utilizando o software *ImageJ* (NIH-National Institutes of Health), onde preconizamos o uso de uma “grade” sobreposta a imagem como ilustra a imagem a seguir (figura 5). Foram contadas as áreas relativas às trabéculas ósseas (Type 1) e espaço medular e medula óssea (Type 2). Em cada imagem, foi delimitada uma área comum no corpo vertebral para realização das contagens. Posteriormente foi calculado o percentual relativo ao tecido ósseo de acordo com a equação (1):

$$\%Tecido\ ósseo = \frac{\textit{área do tecido ósseo}}{\textit{área total}} * 100 \quad (1)$$

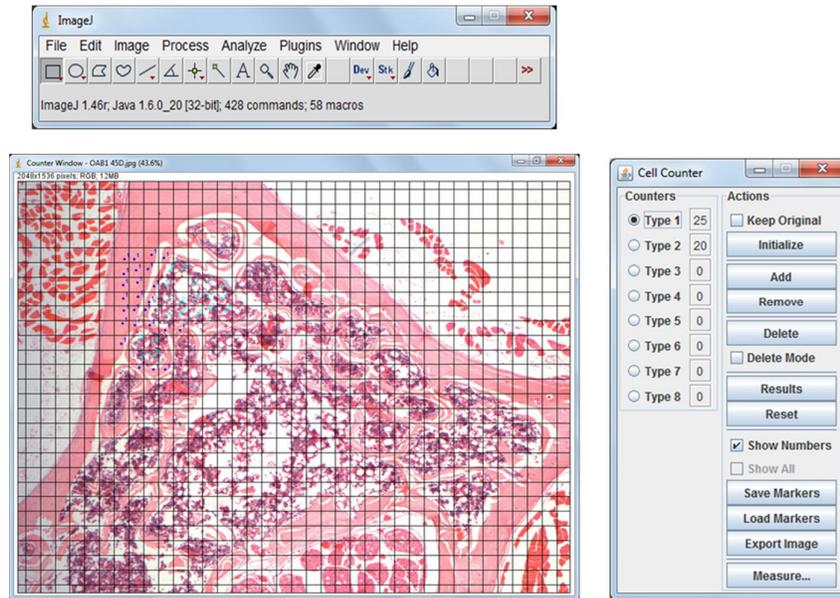


Figura 5: Tela do programa *ImageJ* com grade sobreposta à fotomicrografia da região do corpo vertebral. Imagem do plugin utilizado para auxílio na contagem dos quadros relativos a trabéculas ósseas.

4 RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica

Os espécimes foram analisados macroscopicamente nas suas dimensões, coloração e fotografados. A figura 6 mostra as vértebras L1 e L2, após a remoção imediata e após fixação por 48 em formol. Não foram observadas diferenças, macroscopicamente, entre os grupos estudados.

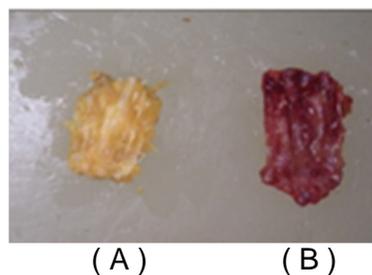


Figura 6 -Vértebras L1 e L2 (A) após a fixação no formol, (B) Peça após a remoção.

4.2 Análise radiográfica

As figuras 7, 8e 9mostram as radiografias digitais das vértebras L1 e L2 dos períodos de 30, 45 e 75 dias respectivamente de cada grupos estudado.

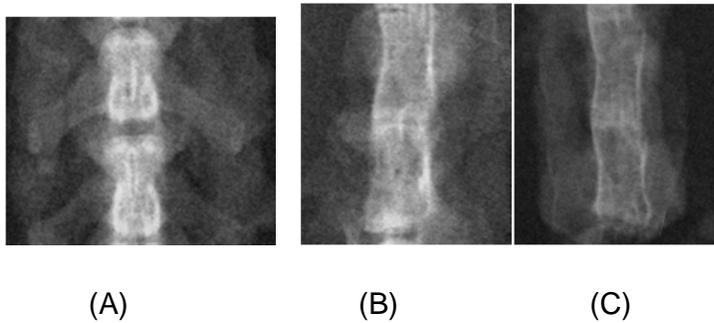


Figura 7- Radiografia digital relativo ao período de 30 dias.

(A) Grupo SHAM (B) Grupo: OVX/NaCl. (C) Grupo:OVX/ALD.

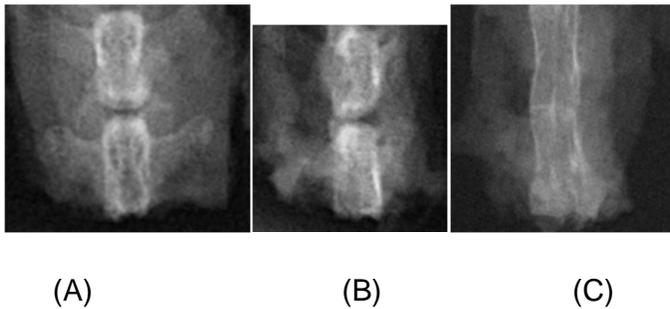


Figura 8- Radiografia digital relativo ao período de 45 dias.

(A) Grupo SHAM (B) Grupo: OVX/NaCl. (C) Grupo:OVX/ALD.

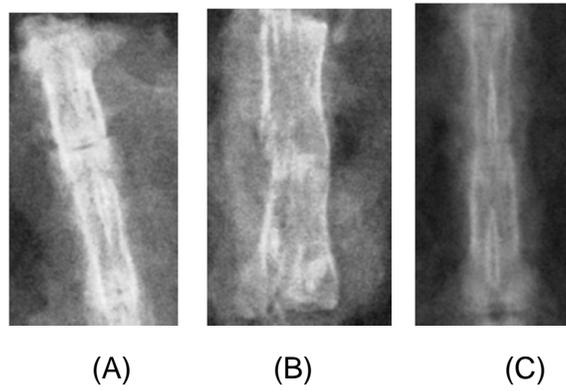


Figura 9 -Radiografia digital relativo ao período de 75 dias. (A) Grupo SHAM (B) Grupo: OVX/NaCl(C) Grupo:OVX/ALD.

4.3 Análise microscópica

A figura 10 mostra fotomicrografia do corte transverso da vértebra lombar de uma peça do grupo OVX/ALD 45 dias, mostrando suas principais estruturas.

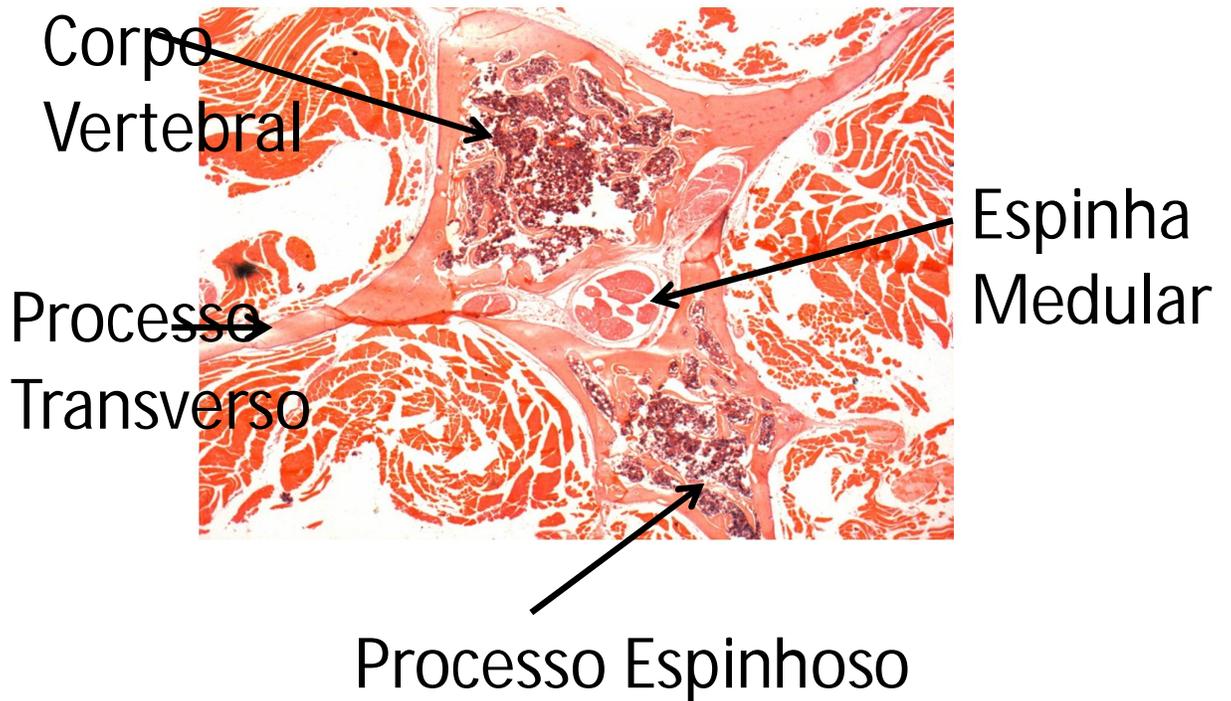


Figura 10: Fotomicrografia do grupo OVX/ALD 15 dias mostrando as principais estruturas. Ampliação de 2 vezes, coloração H.E.

A figura 11 ilustra fotomicrografias dos grupos, SHAM; OVX/NaCl e OVX/ALD da região do corpo vertebral da vértebra, nos períodos de tempo de 30, 45 e 75 dias de tratamento para demonstração da progressão do experimento.

A tabela 1 mostra os resultados da morfometria de tecido ósseo de acordo com o período de tratamento e o grupo. Os valores estão representados pela média e pelo desvio padrão. Esses resultados estão também representados em forma de gráfico (figura 12).

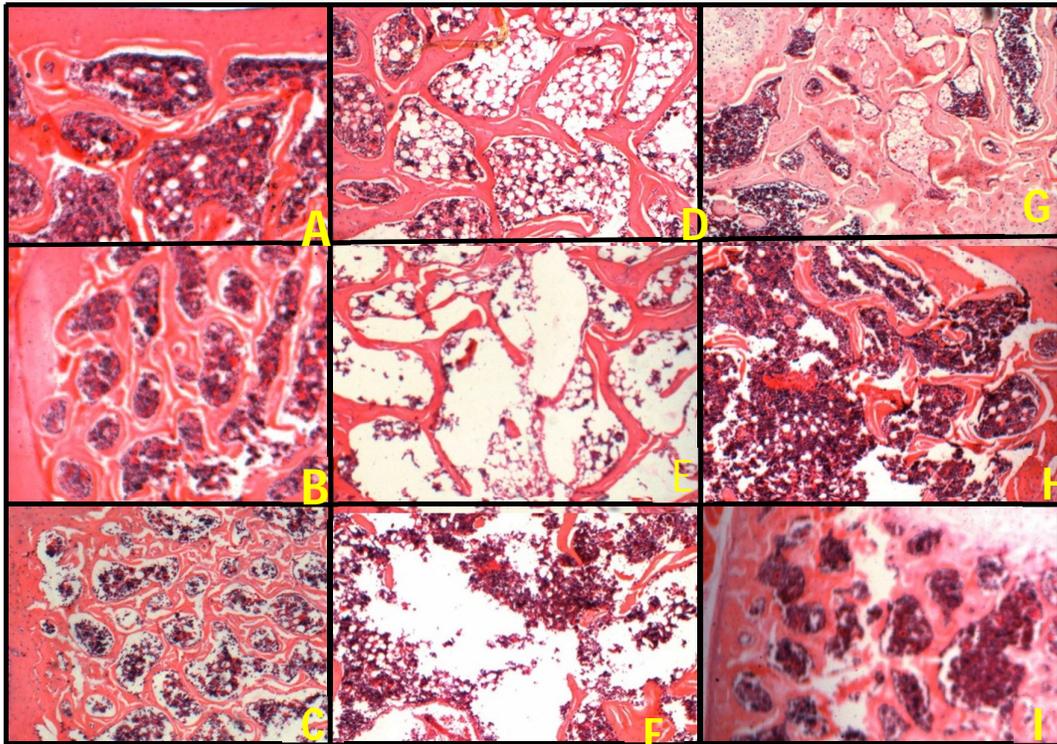


Figura 11 : Fotomicrografia do grupos SHAM (A, B, C); OVX/NaCl (D,E, F); OVX/ALD (G,H,I) da região do corpo da vértebra, nos períodos de 30, 45 e 75 dias. Com ampliação de 4x e coloração HE.

Tabela 1: Resultados da Histomorfometria do tecido ósseo, de acordo com o grupo experimental e período de análise. Os resultados estão representados pelo valor médio e desvio padrão.

	30 dias	45 dias	75 dias
SHAM NaCl	59.3 ± 9.1	59.7 ± 6.6	43.9 ± 11.8
OVX NaCl	38.6 ± 7.7	41.8 ± 7.4	42.7 ± 3.2
OVX ALD	63.7 ± 1.8	56.3 ± 1.5	62.4 ± 7.2

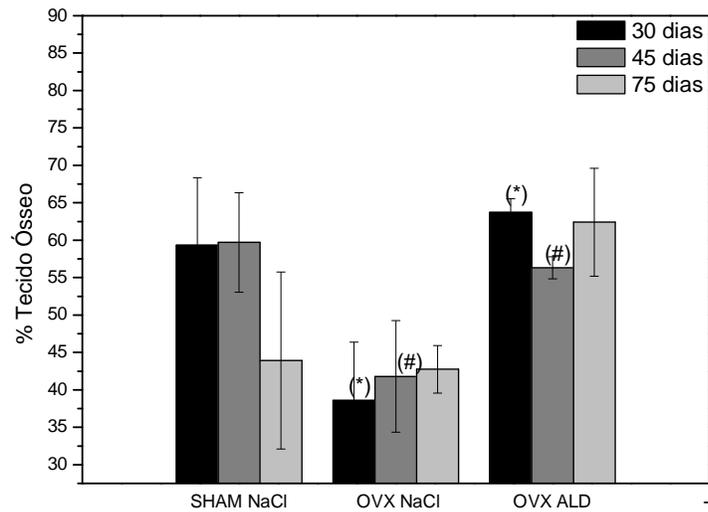


Figura 12: Morfometria do Tecido ósseo de acordo com os períodos e grupo de estudo. Símbolos iguais representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey)

5 DISCUSSÃO

O aumento da população de idosos e conseqüentemente da incidência de doenças crônicas e degenerativas como a osteoporose é uma realidade mundial. A osteoporose é caracterizada pela deterioração progressiva dos ossos devido à remodelação óssea desequilibrada com predomínio de fenômenos reabsortivos levando a maior fragilidade óssea. Esta doença constitui um problema de saúde pública de grande impacto social e econômico(MESQUITA,2009)

Com a supressão hormonal, que ocorre quando a mulher entra na menopausa.As duas etapas da remodelação óssea são exacerbadas, sendo a reabsorção de forma mais proeminente que a formação, conseqüentemente a perda óssea é maior, o que causa predisposição a fraturas. (MODESTO FILHO, 1996)

Numerosos estudos são desenvolvidos nesta área, pois a perda de massa óssea, principalmente de osso trabecular, é grande e traz sérias conseqüências aos idosos, como um maior risco da ocorrência de fraturas, principalmente nas vértebras lombares e no colo do fêmur (BANDEIRA , 2000).

As fraturas osteoporóticas vertebrais são responsáveis por dor de difícil tratamento e pelo comprometimento estético causando envergadura nas costas. 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. Todas essas conseqüências levam à necessidade de mais atendimento médico, ao consumo de muitos medicamentos e à perda da qualidade de vida. Por essas literaturas podemos justificar a necessidade de pesquisas pela busca de medicamentos que possam modificar este quadro(MESQUITA ,2009).

Recentementenovas pesquisas foram realizadas, descobrindo novos tratamentos, para diversas enfermidades e pela melhoria na estrutura de atendimento médico, levando melhor qualidade de vida para a população idosa. Entretanto, doenças crônicas e degenerativas passaram a predominar na atualidade, em detrimento das doenças infecciosas e parasitárias. Entre outras patologias crônicas, destaca-se a osteoporose, com uma importância

crucial na qualidade de vida da população idosa, sendo muito estudada recentemente. (BANDEIRA, 2000)

Descobriu-se que os bifosfonatos inibem a reabsorção óssea após experiências, na década de sessenta, para a identificação de agentes semelhantes ao pirofosfato que pudessem também regular a calcificação óssea, sendo potencialmente úteis para a prevenção de calcificações ectópicas. (ROGERS, 1999)

O efeito primordial dos bifosfonatos farmacologicamente ativos é a inibição de reabsorção óssea, agindo exatamente no tecido ósseo e interferindo na ação dos osteoclastos. Acredita-se que medicamento em questão seja internalizados pelos osteoclastos e interfiram com processos bioquímicos que resultam em apoptose. Como os bifosfonatos agem no organismo ainda é objeto de estudo. Estes medicamentos são utilizados atualmente para o tratamento de várias doenças caracterizadas pelo aumento da reabsorção óssea, como doença de Paget do osso, osteoporose e mieloma múltiplo. (BERENSON, 2002)

Mais recentemente, a combinação de terapias tem sido proposta e resultados em modelos animais tem demonstrado a sua eficácia. Sakai e colaboradores demonstraram que análogos de vitamina D e Bifosfonatos podem ser mais eficazes do que a monoterapia com Bisfosfonato para a prevenção de perda óssea, o que diminui a incidência de fraturas. (SAKAI, 2012)

Na literatura científica a rata ovariectomizada é um modelo bastante utilizado por muitos pesquisadores para o estudo da osteoporose pelo fato das perdas ósseas nestes animais serem semelhantes às ocorridas em mulheres pós-menopausa (FROST, JEE, 1992; WRONSKI YEN, 1991).

Os efeitos da ovariectomia no metabolismo ósseo de ratas já podem ser observados após 60 dias da cirurgia, tempo escolhido para este estudo. No presente estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar submetidas à ovariectomia bilateral. Aguardou-se 60 dias para o início dos tratamentos.

A região das vertebrae lombares L1 e L2 foram escolhidos para verificar o efeito dos medicamentos, porque representam áreas críticas para análise de comprometimento pela osteoporose.

Durante o período de preservação os animais foram acompanhados e não houve nenhuma alteração significativa e nenhuma reação incomum dos animais. As imagens radiográficas mostram a região de estudo. Porém devido à sobreposição de estruturas, não se pode visualizar com precisão a progressão da perda óssea. Já os resultados microscópicos demonstraram que o grupo SHAM/NaCl, que sofreu “falsa” ovariectomia não apresentou perda significativa de tecido ósseo. No grupo OVX/NaCl observa-se a mimetização da condição pós menopausa com redução na espessura das trabéculas ósseas. Já as imagens do grupo OVX/ALD são semelhantes ao grupo SHAM, demonstrando o efeito protetor dado pelo Alendronato. Esses resultados são confirmados pela análise histomorfométrica. Os percentuais de tecido ósseo no grupo OVX/NaCl, ou seja, grupo ovariectomizado não tratado foram menores em relação ao grupo OVX/ALD, tratado com Alendronato de sódio, quando são comparados o mesmo período de tratamento ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey). Esses dados estão em concordância com outros dados da literatura (BERENSON, 2002; SAKAI 2012) que também comprovaram a eficácia do Alendronato de sódio no tratamento da osteoporose pós-menopausa com aumento da densidade mineral óssea na região das vértebras.

6 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho demonstram a perda progressiva de tecido ósseo devido à ovariectomia e que o Alendronato de Sódio é eficiente na manutenção da massa óssea em ratas submetidas à supressão hormonal.

7 REFERÊNCIAS

1. APOROS. (2012). "Associação Nacional contra a Osteoporose " Retrieved 22-12-2011, from <http://www.aporos.pt/>
2. Adler, R. A. (2012). Laboratory testing for secondary osteoporosis evaluation. *Clinical Biochemistry*: 1-7.
3. BOYDE, A.; ALI, n. n.; JONES, S. J. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. **Br Dent J**, v. 156, n. 6, p. 216-20, 1984.
4. BANDEIRA F, et al. Osteoporose: epidemiologia, genética e patogênese da Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.
5. BROWN, J. P.; JOSSE, R. G. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Can Med Assoc J*, v. 167, n. 10, p. s1-s34, 2002.
6. BLOCK J.E, et al. Preventing osteoporosis with exercise: A review with emphasis on methodology. *Medical Hypothesis*, v. 30 (1), p. 9-19, 1989.
7. Bandeira F, et al. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. 390p. Cap 3, p.31-49; Cap 22, p.351-72.
8. Berenson JR, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. Sept, v. 20 (17), p. 3719-33, 2002.
9. FRISOLI JUNIOR, A; et al. O tratamento da osteoporose no paciente idoso deve ser o mesmo que o da pós-menopausa? *Revista Brasileira de Reumatologia*. V. 37 (4): 210-216, 1997.
10. FROST, H. M. A new direction for osteoporosis research: A review and proposal. *Bone*, v. 12, p. 429-37, 1991.
11. FROST HM,; JEE WSS. On the rat model of human osteopenia and osteoporosis. *Bone Mine*. 1992;18(3):227-236.
12. Fisher A, et al. Use and hip fracture epidemiology: ecologic proof from the contrary. *Clin Interv Aging*. 2010;5:355-62
13. GUARNIERO. Osteoporose na mulher. *RBM*. 2008;65(6):179-85.
14. GALI, J.G. Osteoporose. *Acta Ortopédica*. V. 9 (2): 53-62, 2001.
15. Hernandez L, et al, Cuoghi OA, Salazar M. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral

- bonesin an experimental model of osteoporosis. *Osteoporos Int.*2012;23(2):467–73
16. Hwang D, Wang HL. Medical contraindications to implant therapy: part I: absolute contraindications. *Implant Dent* 2006; 15(4): 353-360.
 17. JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO. J. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
 18. Modesto Filho J, Azevedo LAP, Azevedo LCP. Tratamento da osteoporose. *J Bras Méd*, v. 71(5/6), p. 77-9, 1996 nov./dez.
 19. MESQUITA GV, et al. Morbimortalidade em idosos por fratura proximal do fêmur. *TexContEnferm.*, v.18(1), p. 67-73, 2009.
 20. NAJJAR, T.; KAhn, D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. *J Oral Surg*, v. 35, n. 5, p. 375-9, 1977.
 21. ROGERS MJ, et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 1999 May, v. 24 (suppl-5), p. 73S-9S, 1999.
 22. SAKAI S, et al. Combination therapy with alendronate and eldcalcitol have therapeutic advantages over monotherapy in improving the strength of the bone. *Bone*, v. 50, p.1054-63, 2012.
 23. SOARES, M.P. Hidroterapia no tratamento da osteoporose. Rio de Janeiro: Sprint, 1999.
 24. SZEJNFELD VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.
 25. TANAKA, M. et al. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *J Prosthet Dent*, v. 79, n. 6, p. 685-90, 1998.
 26. THOMPSON, D.D.; et al. FDA Guidelines and animal models for Osteoporosis. *Bone* ,v.17, n.4, p.125S-132S, 1995.
 27. Vegger JB, et al. Additive effect of PTH (1-34) and zoledronate in the prevention of disuse osteopenia in rats. *Bone*. 2014 Jun 24. [Epubahead of print]
 28. WENDER, M.C.O; TOURINHO, T.F. Osteoporose na pós-menopausa. *Revista Clinica e Terapêutica*, V. 30 (3): 136- 140, 2004
 29. WRONSKI TJ, YEN CF. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cell Mater*; v. 1, p. 69-74, 1991.

30. XIONG H, et al. Effect of an estrogen-deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. *J Endod*, v. 33(11), p.1304-8, 2007.
31. YAMAZAKI H, SASAKI T. Effects of osteoprotegerin administration on osteoclast differentiation and trabecular bone structure in osteoprotegerin-deficient mice. *J ElecMicr*, v. 54(5), p. 467-77, 2005.
32. YAO X, et al. Morphological alterations in growth plate cartilage of ovariectomized mice. *Med MolMorphol*, v. 39(4), p. 193- 7,2006.
33. ZERBO RI, et al. Localization of osteogenic and osteoclastic cells in porous β -tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials*, v. 26, p. 1445-51, 2005.

ANEXO 1 – 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.59, intitulado:

“ HISTOMORFOMETRIA E ANÁLISE RADIOGRÁFICA COMPARATIVA DE VERTEBRAS DE RATAS NORMAIS , OVARECTOMIZADAS NÃO TRATADAS E TRATADAS COM ALENDRONATO DE SÓDIO “

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