

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

**Densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas associada à
administração sistêmica de bisfosfonatos**

Taiana Aparecida De Lima Silva

Brasília, 11 de março de 2020

Taiana Aparecida De Lima Silva

**Densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas associada à
administração sistêmica de bisfosfonatos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

Orientador: André Ferreira Leite

Brasília, 2020

Taiana Aparecida De Lima Silva

Densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas associada à administração sistêmica de bisfosfonatos

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 11 de março de 2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. André Ferreira Leite (Orientador)

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Profa. Dra. Carla Ruffeil Moreira Mesquita

*Dedico esta dissertação,
à minha amada mãe, Maria Lúcia, por tudo que fez por mim, toda
educação proporcionada, todo amor, exemplo de luta e carinho,
aos meus irmãos, Tatiana, Junior, Rodrigo e Luciano, por serem
tão especiais e sempre confiarem em mim
ao meu namorado, Jackson, por todo suporte e amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor André Leite, por ter sido prestativo, acolhedor, incentivador e entusiasta. Muito obrigada por ter me ajudado nesse momento marcante da minha vida. Obrigada por se manter calmo, mesmo com a distância não perder o contato e me compreender mesmo após as adversidades. Agradeço por me apoiar. Obrigada pela dedicação e confiança. Sem as suas orientações e esforço, esse trabalho não teria se concretizado.

Ao Professor Paulo, por ter me ajudado desde o início, por ter sido prestativo, esclarecedor e compreensível. Obrigada por toda a colaboração nesse trabalho. Sua ajuda e conselhos foram primordiais para a conclusão do estudo.

Às Professoras Carla e Nilce, por terem me ajudado e estimulado nos momentos cruciais na tomada de decisões durante o andamento da pesquisa.

Aos veterinários, Rafael e Mariana, por terem me ajudado na fase prática da pesquisa e no manejo dos animais. Obrigada pela disponibilidade de tempo e atenção.

Ao técnico do biotério, Wilson, pelo cuidado no tratamento dos animais.

À clínica IMEB e ao médico, Daniel, por terem colaborado no estudo e pela enorme ajuda.

Aos alunos da UnB, Nathália, Túlio e Jieni, pela ajuda, disponibilidade de tempo e comprometimento com a pesquisa.

Aos amigos, Tassiane, Paula, Bárbara e Luiz, a minha prima, Thaís, e ao meu namorado, Jackson, pelo apoio, companheirismo, carinho, conselhos nos momentos difíceis e pelos bons momentos vividos.

Aos meus pais e irmãos, por sempre me apoiarem e confiarem em mim.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.

Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

No diagnóstico de osteoporose, a diminuição da densidade mineral óssea pode ser identificada em exames de imagem. Em modelos animais, a cirurgia de ovariectomia permite a diminuição da concentração de estrógeno, um hormônio com impacto sobre o metabolismo ósseo, mimetizando dessa forma o processo osteoporótico pós-menopausa. Potenciais efeitos na densidade mineral dos tecidos ósseos ocorrem no tratamento com uso de medicamentos como os bisfosfonatos. O objetivo deste estudo foi analisar, por meio da absorciometria por dupla emissão de raios-x, as alterações na densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas. O estudo também verificou o efeito do tratamento com bisfosfonatos na densidade mineral nesses animais. Oitenta ratas da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* foram divididas aleatoriamente em 5 grupos experimentais de acordo com o protocolo de indução para indução de osteoporose e de exposição aos bisfosfonatos. Três grupos sofreram ovariectomia e foram divididos em: OVXA, ovariectomia sem exposição à bisfosfonatos; OVXA+RIS, ovariectomia com exposição ao bisfosfonato resindronato de sódio; OVXB, ovariectomia. Dois grupos controles, não submetidos à ovariectomia, formam os grupos ControleA e ControleB. Procedimento cirúrgico de remoção dos ovários foi realizado bilateralmente nos grupos OVXA, OVXA + RIS e OVXB. Procedimento cirúrgico semelhante, sem a ovariectomia (cirurgia *Sham*), foi realizado bilateralmente nos grupos Controle A e Controle B. Após 10 semanas da cirurgia, foi realizado exame inicial de densitometria óssea pelo equipamento de absorciometria por dupla emissão de raios-x DXA (Lunar Prodigy Advance, GE Healthcare) nos grupos Controle A, OVXA e OVXA + RIS. Após o exame inicial, a administração dos bisfosfonatos (risedronato de sódio) foi iniciada. Nos grupos sem exposição aos bisfosfonatos, foi administrada substância placebo. Ao final do experimento, a densitometria óssea foi realizada em todos os grupos para análise de alterações na densidade mineral óssea (DMO) de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total. Foi observado o aumento da densidade mineral óssea em todos os grupos experimentais. A densidade da região da pelve, em ratas ovariectomizadas foi menor que as que receberam tratamento com

bisfosfonato. Conclui-se nesse trabalho que a densidade mineral óssea na região da pelve de ratas submetidas a cirurgia de ovariectomia obteve aumento após a administração sistêmica de bisfosfonatos.

Palavras-chave: Ovariectomia; Bisfosfonatos; DMO, densidade mineral óssea; DXA, absorciometria por dupla emissão de raios-x, modelo animal.

ABSTRACT

In the diagnosis of osteoporosis, a decrease in bone mineral density can be identified in imaging studies. In animal models, ovariectomy surgery decreases the concentration of estrogen, a hormone with an impact on bone metabolism, thus it mimics post-menopausal osteoporotic process. Potential effects on bone mineral density occurs due to treatment with drugs such as bisphosphonates. The aim of this study was to analyze, through dual x-ray emission absorptiometry, changes in bone mineral density in ovariectomized rats. The study researched the effects of treatment with bisphosphonates on the mineral density of animals. Eighty female *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*) were randomly divided into 5 groups of experiments according to the induction protocol for inducing osteoporosis and exposure to bisphosphonates. Three groups underwent ovariectomy and were divided into: OVXA, ovariectomy without exposure to bisphosphonates; OVXA + RIS, ovariectomy with exposure to resonated sodium bisphosphonate; OVXB, ovariectomy. Two control groups, without the use of ovariectomy, form the ControlA and ControlB groups. The surgical procedure to remove the ovaries was performed bilaterally in the OVXA, OVXA + RIS and OVXB groups. A similar surgical procedure, without ovariectomy (Sham surgery), was performed bilaterally in the Control A and Control B groups. After 10 weeks of surgery, the initial bone densitometry examination was performed using the DXA X-ray absorption equipment (Lunar Prodigy Advance, GE Healthcare) in the Control A, OVXA and OVXA + RIS groups. After the initial examination, bisphosphonates (risedronate sodium) were started. In groups without exposure to bisphosphonates, a placebo substance was administered. At the end of the experiment, bone densitometry was performed in all groups to analyze changes in bone mineral density (BMD) in the head, right leg, spine, pelvis and total regions. Bone mineral density increase was observed in all experimental groups. The density of the pelvis region, in ovariectomized rats, was lower than the treated with bisphosphonate. It was concluded in this work that the bone mineral density in the pelvis region of rats submitted to ovariectomy surgery increased after the systemic administration of bisphosphonates.

Keywords: Ovariectomy, Bisphosphonates, BMD, bone mineral density, DXA, Dual-energy X-ray absorptiometry, animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma sequência de acontecimentos.

Figura 2 - Preparação pré-cirúrgica: a) assepsia; b) campo operatório

Figura 3 - Ovariectomia: a) incisão; b) exposição do ovário; c) amarela e excisão do ovário; d) parte do útero e tecido retirado.

Figura 4 - Cirurgia de simulação de Ovariectomia: a) exposição do ovário; b) recolocação no interior do abdômen; c) sutura peritônio.

Figura 5 - Apreensão manual e gavagem para administração do medicamento.

Figura 6 - Divisão dos grupos experimentais A para a realização do tratamento.

Figura 7 - Seleção dos pontos de interesse

Figura 8 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da cabeça (g/cm^2) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

Figura 9 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da perna direita (g/cm^2) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

Figura 10 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da coluna (g/cm^2) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

Figura 11 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da pelve (g/cm^2) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

Figura 12 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) total (g/cm^2) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham;

OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

Figura 13 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da cabeça (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 14 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da perna direita (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 15 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da coluna (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 16 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da pelve (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 17 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da pelve (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média (desvio padrão), Mediana (valor mínimo e valor máximo) da densidade mineral óssea (DMO) de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo.

Tabela 2- Média (desvio padrão), Mediana (valor mínimo e valor máximo) da variação na densidade mineral óssea (DMO) no tempo 2 (Final) em relação ao tempo 1 (10 semanas após a cirurgia), de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo.

Tabela 3- Média (desvio padrão) da densidade mineral óssea (DMO) de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total (g/cm²) em função do grupo (grupos B).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Processo de remodelação óssea.....	16
1.2 Osteoporose.....	17
1.3 Metabolismo estrogênio.....	19
Método de avaliação da densidade mineral óssea.....	20
1.4 Tratamento osteoporose.....	21
1.5 Bisfosfonatos.....	22
1.7 Modelo animal para osteoporose.....	23
1.8 Ovariectomia.....	24
2. PROPOSIÇÃO.....	26
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	27
3.1 Amostra.....	27
3.2 Grupos experimentais.....	27
3.3 Cirurgia de ovariectomia.....	28
3.4 Cirurgia de simulação de ovariectomia.....	31
3.5 Medicação.....	32
3.6 Densitometria.....	34
3.7 Análise da densidade mineral óssea.....	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Análise dos grupos A.....	37
4.1.1 Hipóteses nulas.....	37
4.1.2 Metodologia da análise estatística.....	37
4.1.3 Resultados dos grupos A.....	37
4.2 Análise dos grupos B.....	47
4.2.1 Hipótese nula.....	47
4.2.2 Metodologia da análise estatística.....	47
4.2.3 Resultados dos grupos B.....	47
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO.....	67

1. Introdução

A osteoporose é globalmente um grande problema de saúde que afeta a população idosa sendo a doença óssea mais comum nos humanos e afeta tanto os homens quanto mulheres. (DUQUE; TROEN, 2008) Nas últimas décadas, problemas referentes à osteoporose pós-menopausa se tornaram uma preocupação mundial devido ao aumento do crescimento da expectativa de vida. (JI; YU, 2015) Ao longo da vida, o tecido ósseo é constantemente formado e reabsorvido mas em pacientes com idade mais avançada esse processo se torna menos eficiente. A osteoporose é uma doença óssea em que ocorre a deteriorização do tecido ósseo na qual os ossos se tornam progressivamente menos densos e mais susceptíveis a fraturas.

Osteoporose é definida como uma doença do esqueleto caracterizada pelo comprometimento da resistência da qualidade óssea, predispondo ao aumento do risco a fraturas. Está relacionada à alteração dos valores na densitometria óssea devido à perda de massa óssea. A medição da densidade mineral óssea, ou BMD, sigla em inglês para *bone mineral density*, é obtida por meio da densitometria óssea. Atualmente, o padrão ouro de densitometria para o seu diagnóstico é pela técnica por absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA). Dessa forma, o seu diagnóstico é confirmado pela densitometria óssea tendo em vista que a osteoporose é uma doença insidiosa que pode evoluir durante muitos anos sem a ocorrência de qualquer sintoma clínico. (GUARNIERO; OLIVEIRA, 2004)

O modelo experimental que mimetiza a deficiência estrogênica pós-menopausa em mulheres é a ovariectomia de ratas, a qual ocorre a diminuição dos níveis do hormônio estrógeno. Em decorrência desse processo, a ovariectomia causa perda óssea. (SIMS et al., 1996) A pesquisa experimental em animais pode melhorar a nossa compreensão da patogênese e da atividade de agentes farmacêuticos na prevenção ou tratamento da osteoporose. (LELOVAS et al., 2008) A ovariectomia (OVX) em ratas está associada a alterações histológicas ósseas semelhantes às que ocorrem no osso humano,

portanto, a sua utilização em pesquisas pode fornecer informações benéficas relacionadas à perda óssea pós-menopausa humana. (PENG et al., 1997)

Os bisfosfonatos são os medicamentos mais utilizados no tratamento da osteoporose. Atuam especificamente no osso devido à grande afinidade pelo mineral ósseo. Dentre esses fármacos, o risedronato tem demonstrado a diminuição da perda óssea como também o aparecimento de sinais de maior mineralização. O seu mecanismo de ação é na interferência na taxa de remodelação do calo ósseo, tendo impacto no atraso da substituição do osso primário, provisório antes da sua mineralização, pelo osso lamelar, com características estruturalmente importantes na função mecânica óssea.

1. 1 Processo de remodelação óssea

O osso é um tecido metabolicamente ativo capaz de adaptar sua estrutura a estímulos mecânicos e reparar danos estruturais através do processo de remodelação. As principais funções desse processo é manter o crescimento adequado na formação da estrutura esquelética, manter os níveis séricos de íons adequados e reparar regiões estruturalmente comprometidas do osso. As células que participam nesse processo – os osteoblastos e os osteoclastos- são de origem diferentes e estão sob mecanismos de controle celular distintos. Vários estímulos afetam a renovação óssea, incluindo hormônios, citocinas e estímulos mecânicos. Todos esses fatores afetam a quantidade e qualidade do tecido ósseo produzido. (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006)

O tecido ósseo sofre, naturalmente, constante processo de remodelação. A remodelação é um processo dinâmico que envolve a formação e a reabsorção do osso bem como a sua mineralização. A remodelação óssea se inicia com a destruição de osso antigo pelos osteoclastos seguido pela deposição de uma matriz osteóide não mineralizada pelos osteoblastos. Posteriormente, essa matriz extracelular é mineralizada, formando o osso novo. Esse processo denominado *turnover* ósseo é um ciclo contínuo de reabsorção e renovação em áreas de remodelação óssea, chamadas de unidades

multicelulares básicas (BMUs) de células que reabsorvem osso (osteoclastos) e células formadoras de osso (osteoblastos). (DUQUE; TROEN, 2008)

Há três tipos principais de células no tecido ósseo: osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes especializadas derivadas dos monócitos/macrófagos do tecido hematopoiético que reabsorvem o osso pela secreção de ácidos e proteases. Durante a reabsorção, os osteoclastos aderem na matriz óssea e secretam enzimas ácidas e líticas que reabsorvem osso na região específica do espaço extracelular entre o osteoclasto e a superfície óssea. (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003) Os osteoblastos são células ósseas de origem mesenquimal que secretam a matriz de osso não mineralizado (osteóide), que eventualmente se mineraliza para produzir o osso maduro. Os osteócitos formam a maior parte das células ósseas. São células maduras derivadas da diferenciação dos osteoblastos que foram incorporados na matriz óssea e ficaram sepultados após a secreção e mineralização da mesma. A sinalização da apoptose de osteócitos é um sinal para a reabsorção pelos osteoclastos. Os osteócitos são células que monitoram a qualidade e o estresse ósseo e também coordenam a remodelação através de fatores de ligação. (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006)

O desequilíbrio na remodelação pode resultar em graves transtornos na estrutura e função do esqueleto, desencadeando no aumento da morbidade e encurtamento da vida útil do indivíduo. A maioria das doenças ósseas ocorrem devido ao excesso da atividade osteoclástica, em virtude da desproporção entre a taxa de formação óssea e a de reabsorção. Dentre essas doenças pode-se incluir osteoporose, doença periodontal, artrite reumatoide, mieloma múltiplo e metástases ósseas. (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003)

1.2 Osteoporose

Osteoporose é uma doença metabólica crônica, de etiologia multifatorial, caracterizada pela diminuição da massa óssea e a deterioração da

microarquitetura do tecido ósseo, podendo ocasionar no aumento do risco de fratura esquelética. (LELOVAS et al., 2008)

De acordo com a OMS, a densidade mineral óssea na osteoporose está a 2,5 desvio padrão abaixo da média da densidade mineral óssea para mulheres adultas jovens saudáveis (o T-score de $<2,5$ SD). Dessa forma, a sua classificação de acordo com o grau de severidade pode variar entre normal, osteopenia, osteoporose e osteoporose severa. (WHO, 2007)

A osteoporose pode ser classificada em duas formas, primária (pós-menopausa e senil) ou secundária. (SCHLIEFKE et al., 2013) Na osteoporose primária, tipo 1, ocorre o aumento da taxa de remodelação devido a queda da concentração de estrogênio durante o período pós-menopausa. A osteoporose primária, tipo 2, é relacionada ao envelhecimento decorrente pela diminuição da formação óssea, pela deficiência crônica de cálcio e pelo aumento da atividade do paratormônio. Na osteoporose secundária ocorre o aumento da atividade osteoclástica pela diminuição da formação de osteoblastos em processos inflamatórios. (GALI, 2001) (KOMORI, 2015)

A complexa patogênese da osteoporose pode estar relacionada com a combinação de fatores genéticos, nutricionais, hormonais e ambientais. Existem muitos fatores de risco para a osteoporose, como tabagismo, uso prolongado de corticosteroide ou medicamentos de alto risco e a ingestão insuficiente de cálcio e vitamina D. (LELOVAS et al., 2008). Estudos mostram a associação entre a osteoporose e a menopausa. (JI; YU, 2015) Contudo, a osteoporose pode afetar de forma localizada ou sistêmica e sua prevalência é em mulheres na pós-menopausa. (SCHLIEFKE et al., 2013)

Na osteoporose relacionada ao envelhecimento, ocorre a perda gradual do tecido ósseo devido a diminuição da atividade dos osteoblastos e a região mais afetada, frequentemente, é o osso cortical. Em contrapartida, na osteoporose relacionada ao período pós-menopausa, a perda óssea é rápida devido ao aumento da atividade dos osteoclastos e a região mais afetada é o osso trabecular. (DUQUE; TROEN, 2008)

1.3 Metabolismo Estrogênio

Durante a menopausa, ocorre a falência de esteroides ovarianos. Sinais que estimulam a reabsorção óssea aumentam com a deficiência de estrogênio, com uma consequente ativação de osteoclastos. Estudos apontam que os osteoblastos e os osteoclastos sofrem apoptose ou morte celular programada. Em decorrência disso, a apoptose dos osteoblastos desencadeia na falha da neoformação óssea, chamada de “osteopenia involutiva” em indivíduos idosos. Nesses pacientes com idade avançada, o número e a função dos osteoclastos diminui e os osteoblastos apresentam uma vida útil mais curta e com grau menos de diferenciação. Portanto, durante a menopausa, sinais que estimulam a reabsorção óssea aumentam devido à deficiência de estrogênio, com consequente ativação dos osteoclastos. (HAGUENAUER et al., 2001)

Evidências histológicas têm demonstrado que a deficiência de estrogênio diminuiu a massa óssea porque o aumento da reabsorção óssea ser maior que o a formação óssea. Com relação a fatores hormonais, mulheres na década pós-menopausa podem apresentar uma diminuição severa da massa óssea, explicando a alta incidência de fraturas osteoporóticas em mulheres em comparação aos homens. (LELOVAS et al., 2008)

A deficiência do estrogênio leva a perda óssea em mulheres e em e grupos experimental de animais. A cirurgia de ovariectomia em ratas é amplamente utilizada como modelo de redução da massa óssea devido a deficiência na liberação de estrogênio. (GOULDING; GOLD, 1989)

No ponto de vista epidemiológico, o a deficiência do estrógeno é um dos principais responsáveis pela osteoporose. Porém, o mecanismo da osteoporose pela diminuição de estrógeno depende da contribuição de outros fatores, já que nem todas as mulheres na menopausa desenvolve osteoporose. (HARADA; RODAN, 2003)

1.4 Método de avaliação da densidade mineral óssea

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO), em inglês *bone mineral density* (BMD), pela absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA) é o padrão-ouro para o diagnóstico clínico de osteoporose. Esse sistema é calibrado para expressar os resultados em gramas por centímetro quadrado (g/cm², gramas de mineral ósseo/cm² de área analisada) gerando o valor de densidade mineral óssea (DMO). Um resultado do T-score DXA com pontuação entre -1 e -2,5 desvio padrão indica uma baixa na massa óssea (osteopenia), enquanto a pontuação igual ou inferior a -2,5 desvio padrão indica a presença de osteoporose. A densidade óssea por DXA é utilizada para a avaliação da eficácia de tratamentos e para estimar o risco de fratura óssea. (OSTERHOFF et al., 2016) O exame por DXA pode ser utilizado em estudos longitudinais para a medição da densidade mineral óssea (DMO) e da taxa de tecido adiposo na composição corporal (BMC), porém nesse exame não é possível diferenciar os índices de osso trabecular e de osso esponjoso. DXA mede a massa óssea e não é possível informar sobre a qualidade e a arquitetura do tecido ósseo. (FERRETTI, 1995)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DMO é a base para o diagnóstico da osteoporose e estudos têm demonstrado correlação do T-score com o aumento do risco de fratura. (ERIKSEN; DÍEZ-PÉREZ; BOONEN, 2014)

A vantagens adicionais do DXA podem ser listadas como, exposição mínima à radiação, segurança no desempenho, pouco tempo para a aquisição da imagem do exame, facilidade de uso e medição do DMO em múltiplos locais do corpo esquelético. (DAPHNE J. THEODOROU*, 2002) No entanto, várias limitações estão associadas às medições da DMO, como por exemplo, DXA não mede a densidade mineral óssea volumétrica verdadeira, não consegue fazer a distinção entre osso cortical e trabecular e não possui uma adequada resolução para medir a arquitetura cortical e trabecular. Por outro lado, muitos

estudos têm sido documentados sobre a relevância da microestrutura trabecular na resistência óssea e a avaliação que tanto a microarquitetura quanto DMO podem ajudar na estimativa do risco de fratura. (SORNAY-RENDU et al., 2007)

Portanto, a absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA) é o método mais utilizado para medir a densidade mineral óssea (DMO). O critério de diagnóstico de osteoporose é baseado no T-score para DMO e este está correlacionado na escolha e emprego de fármacos no tratamento de osteoporose. (WHO, 2007)

1.5 Tratamento Osteoporose

Para o tratamento da osteoporose as terapias têm como objetivo a prevenção do surgimento de fraturas, preservação e o aumento da massa óssea. Existem diferentes terapias farmacológicas para o tratamento da osteoporose como os inibidores da reabsorção óssea, que diminuem a taxa de perda óssea (por exemplo, bisfosfonatos, denosumab, raloxifeno e estrogênio) e os agentes que estimulam a formação de tecido ósseo como por exemplo a teriparatida. Dentre a classe dos bisfosfonatos os fármacos mais utilizados no tratamento da osteoporose são aledronato, etidronato, ácido zoledrônico e risedronato. Devido a natureza crônica da doença e o surgimento de novas fraturas com o aumento da idade, é necessário o uso da medicação por longo prazo, normalmente superior a 3 anos, para prevenção e tratamento dos pacientes. (ERIKSEN; DÍEZ-PÉREZ; BOONEN, 2014)

Como qualquer terapia medicamentosa, os bisfosfonatos apresentam efeitos adversos que podem causar risco ao paciente. Esses graves efeitos, como a osteonecrose de mandíbula, fibrilação atrial e fraturas femorais atípicas, devem ser balanceados aos benefícios da terapia, como a diminuição do surgimento de fraturas e o aumento da densidade óssea. Com intuito da diminuição desses efeitos adversos, muitas vezes é implementado como parte da terapia a interrupção da medicação por intervalo de anos até que não haja o

surgimento de novas fraturas ou a diminuição da densidade óssea do T-score de -2,5 ou mais desvio padrão em DXA. (MARCHAND; LOSHAK, 2019)

De acordo com Riggs e Melton III (1992), o tratamento da osteoporose a partir de drogas ocorre com dois tipos principais de drogas, aquelas que reduzem o desgaste dos ossos e aquelas que incrementam a formação dos ossos. Khosla e Shane (2016) apontam que, ao longo dos anos, foram feitos avanços consideráveis no diagnóstico e tratamento da osteoporose.

Durante tratamento com as drogas que reduzem o desgaste nos ossos, os ossos apresentam alterações moderadas ou mesmo não apresentam alterações, esse resultado faz com que os pacientes continuem sofrendo fraturas, porém em um número menor de ocorrências (Riggs e Melton III). Já Tabatabaei-Malazy, Ozra, et al. (2017), aponta outras formas de cuidado com a doença, como uma dieta equilibrada, atividade física diária, baixo consumo de álcool e cafeína, suspensão de uso de cigarros, além de suporte emocional e afetivo, como importantes agentes na saúde óssea, bem como, tratamentos cirúrgicos como a vertebroplastia e a quifoplastia para alívio das dores.

1.6 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são os medicamentos primeira de escolha no tratamento da osteoporose. Atuam nas células ósseas pela inativação do processo de reabsorção óssea e acelerando a apoptose dos osteoclastos. Os bisfosfonatos podem aumentar a densidade mineral óssea e diminuir o risco de surgimento de fratura esquelética. (TABATABAEI-MALAZY et al., 2017)

Os bisfosfonatos são fármacos com propriedades antirreabsortivas que diminuem o *turnover* ósseo na remodelação óssea, inibindo a ação dos osteoclastos. São amplamente utilizados na prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres. Atualmente, existem diversas terapias com o uso de bisfosfonatos, como aledronato, ibandronato, ácido zoledrônico e risedronato, para o tratamento da osteoporose pós-menopausa. Esses medicamentos

exibem diferença no grau de potência, ação farmacológica e afinidade de ligação à hidroxiapatita da superfície óssea. (RUSSELL et al., 2008)

Atualmente, os bisfosfonatos estão disponíveis para administração tanto por via oral em formulações de dose diária, semanal ou mensal para o alendronato, risedronato e ibandronato, quanto para administração por via intravenosa em formulação anual para ácido zoledrônico e bimestral ou trimestral para ibandronato. Essas divergências entre as vias de administração e as formulações contribuem na diferença do metabolismo dos medicamentos, na adesão à superfície óssea e no tempo de tratamento. (ERIKSEN; DÍEZ-PÉREZ; BOONEN, 2014)

Dentre os bisfosfonatos, o risedronato é um aminobifosfonato usado no tratamento da osteoporose pós-menopausa, na dose diária de 5mg ou semanal de 35mg, por um período de doía a três anos. Durante a terapia com bisfosfonatos, os osteoclastos se ligam ao osso, mas não inibidos de funcionar normalmente. O risedronato é um bisfosfonato que exerce seus efeitos clínicos através da ligação à hidroxiapatita do tecido osso inibindo a atividade dos osteoclastos. Em estudos longitudinais de longo prazo de até 7 anos, foi observado a redução de 59% no risco relativo de fratura vertebral em pacientes mulheres na pós-menopausa que fizeram terapia com o risedronato na dose de 5mg/dia. (UMLAND; BOYCE, 2001)

1.7 Modelo animal para osteoporose

Atualmente, osteoporose da pós-menopausa é um dos maiores problemas de saúde da mulher. Por ser uma doença de progressão lenta, demoraria anos para o surgimento de novas terapias em estudos em humanos. Dessa forma, estudos de osteoporose pós-menopausa em modelo animal buscam entender a patogênese da doença, investigar novas terapias e a elaboração de próteses para osso osteoporótico. A utilização de não primatas em modelo animal como cães, gatos, coelhos, roedores e mini porcos apresentam suas vantagens e desvantagens. Frente a estudos em humanos, o uso de animais promove grupos experimentais mais homogêneos e permite

que novas terapias sejam testadas com a diminuição dos gastos. (TURNER, 2001)

As vantagens do uso de ratos são o baixo custo, facilidade de alojamento e homogeneidade dos grupos. O modelo mais comum em estudos de osteoporose é o modelo com roedores. Ratas ovariectomizadas apresentam a maioria das características de humano com osteoporose pós-menopausa. Por apresentarem a vida útil mais curta, os roedores têm sido amplamente utilizados em estudos sobre os efeitos do envelhecimento no osso, portanto, sabe-se muito sobre a renovação óssea e o efeito da dieta nesse processo. (TURNER, 2001) (POPOVIĆ et al., 2016)

Ratos laboratoriais atendem á maioria dos critérios para elaboração de estudos em modelos animais. Critérios estes que são necessários para cumprir e atender boas práticas clinicas, como a aprovação das considerações éticas e legislativas nacionais e locais, serem acessíveis aos centros experimentais, serem de fácil e seguro manuseio, terem um baixo custo de aquisição e cuidado, requererem pouca manutenção e reproduzirem com segurança a doença e o material a ser examinado no estudo. (LELOVAS et al., 2008)

1.8 Ovariectomia

A cirurgia de ovariectomia é geralmente utilizada em modelos animais para mimetizar a osteoporose decorrente do período pós-menopausa. A diminuição da massa óssea ocorre devido ao aumento da reabsorção óssea em conjunto ao desalinhamento da função dos osteoblastos e a deficiência de estrogênio. O mecanismo que elucidada a disfunção dos osteoblastos ainda não está esclarecido, mas sabe-se que a apoptose de osteoclastos é induzida por receptores alfa de estrogênio. (KOMORI, 2015)

É necessário entender os princípios da remodelação na patogênese da osteoporose. A perda da massa óssea acontece através do desarranjo do processo normal de remodelação óssea. Os ciclos de remodelação sofrem com a ação dos processos fisiológicos, patológicos e terapêuticos. (TURNER, 2001)

No período pós-menopausa, ocorre o aumento acelerado da remodelação óssea, aumentando nas taxas de formação e reabsorção do metabolismo ósseo. Deficiência na taxa de estrogênio em mulheres, promove um desequilíbrio em que ocorre uma maior remodelação, prolongando a fase reabsortiva com a redução de apoptose de osteoclastos, e encurtando a fase formativa, com a apoptose de osteoblastos. Como consequência, a quantidade de volume ósseo reabsorvido é maior que a quantidade de osso formado pelos osteoblastos. (HARADA; RODAN, 2003)

2. Proposição

Este trabalho tem como objetivo analisar, por meio da absorciometria por dupla emissão de raios-x, as alterações na densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas. O estudo também verificará o efeito do tratamento com bisfosfonatos na densidade mineral nesses animais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostra

Para a realização deste trabalho foi utilizada uma amostra de 80 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás. Os animais tinham cerca de 70 dias de idade e peso aproximado de 200 gramas. Durante todo o período experimental, os animais foram alocados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. O trabalho, protocolo nº 60906/2016, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade de Brasília.

Antes do início do experimento as ratas permaneceram por duas semanas para aclimatização. Após esse período de adaptação no biotério, os animais foram aleatoriamente distribuídos e abrigados em grupos de quatro animais com espaço suficiente para movimentação em caixas de polipropileno devidamente forradas com maravalha estéril. Permaneceram mantidos em ciclo claro/escuro de iluminação de 12/12h, com temperatura ambiente controlada, acesso sem restrições à alimentação sólida, na forma de ração, e água *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos randomizadamente em 5 Grupos experimentais:

- a) Grupo Controle A- ratas *Sham* (falso ovariectomizadas) e tratadas com soro fisiológico, via oral (gavagem).
- b) Grupo OVX A- ratas ovariectomizadas e tratadas com soro fisiológico, via oral (gavagem)

- c) Grupo OVX A + RIS – ratas ovariectomizadas e tratadas com risedronato sódico (Risedross), via oral (gavagem), 2,5mg/kg/semana por 1 mês.
- d) Grupo Controle B – ratas *Sham* (falso ovariectomizadas)
- e) Grupo OVX B – ratas ovariectomizadas.

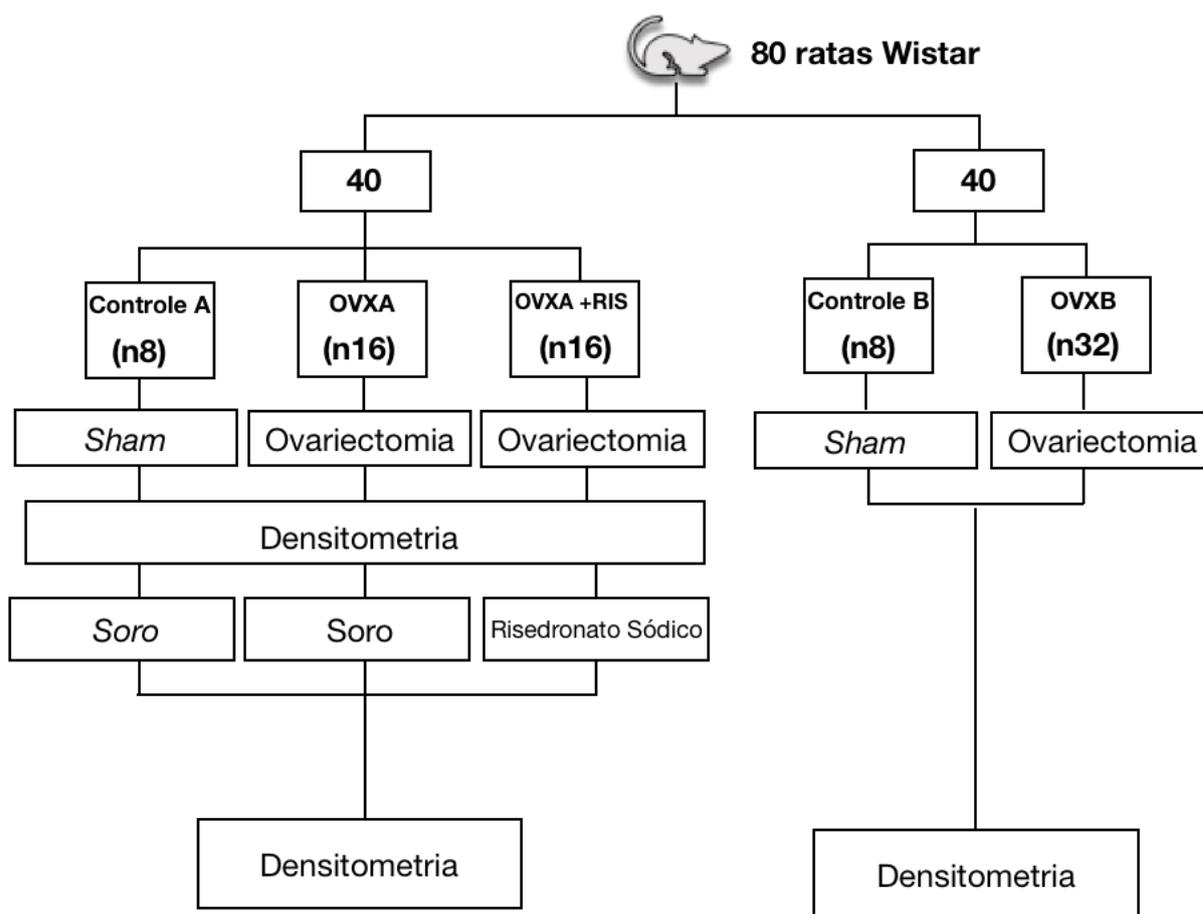


Figura 1- Organograma sequência de acontecimentos.

3.3 Cirurgia de Ovariectomia

Para a indução da osteoporose, os animais foram ovariectomizados bilateralmente e para todos os procedimentos cirúrgicos as ratas receberam anestesia geral com solução aquosa de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin),

anestésico geral, associado a cloridrato xilazina 2% (Xilazin), substância sedativa e relaxante muscular, na dose 100mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente, por via intraperitoneal.

Antes de iniciar a cirurgia e durante todo decorrer do procedimento cirúrgico, a efetividade da anestesia geral foi realizada pela compressão do rabo e das patas para avaliar os reflexos periféricos juntamente com o controle da frequência respiratória através da observação visual. Durante o procedimento cirúrgico, uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% foi colocada sobre os olhos dos animais para prevenir o ressecamento das córneas.

Após a anestesia geral, foi realizada bilateralmente a tricotomia do pelo na região lateral. Os animais foram posicionados em posição decúbito lateral, seguida pela antisepsia do campo operatório com álcool iodado e colocação do campo fenestrado. (Figura 2) Foi realizado um pequeno corte longitudinal com extensão média de 1 cm com tesoura na camada epitelial e uma incisão com lâmina de bisturi número 11 na camada muscular na região entre o bordo superior da coxa e a última costela para exibição da cavidade peritoneal. Após a sua identificação embebido na massa de tecido adiposo, o ovário foi exposto para fora da cavidade abdominal com o auxílio de uma pinça. Com fio absorvível, foi realizado uma sutura simples para ligadura das tubas uterinas e artérias ováricas em cada região adjacente ao ovário para a contenção de hemorragia da vasculatura local. O ovário foi excisado junto a tecidos moles adjacentes e as trompas foram reposicionadas dentro na cavidade abdominal. (Figura 3) Por fim, foi realizada a sutura local, na camada muscular e no peritônio foi efetuado sutura contínua com fio de sutura absorvível e na camada epitelial da pele foi efetuado sutura com pontos simples com fio de *nylon* de modo a fechar as margens do retalho. Estes procedimentos foram realizados bilateralmente.

a)



b)

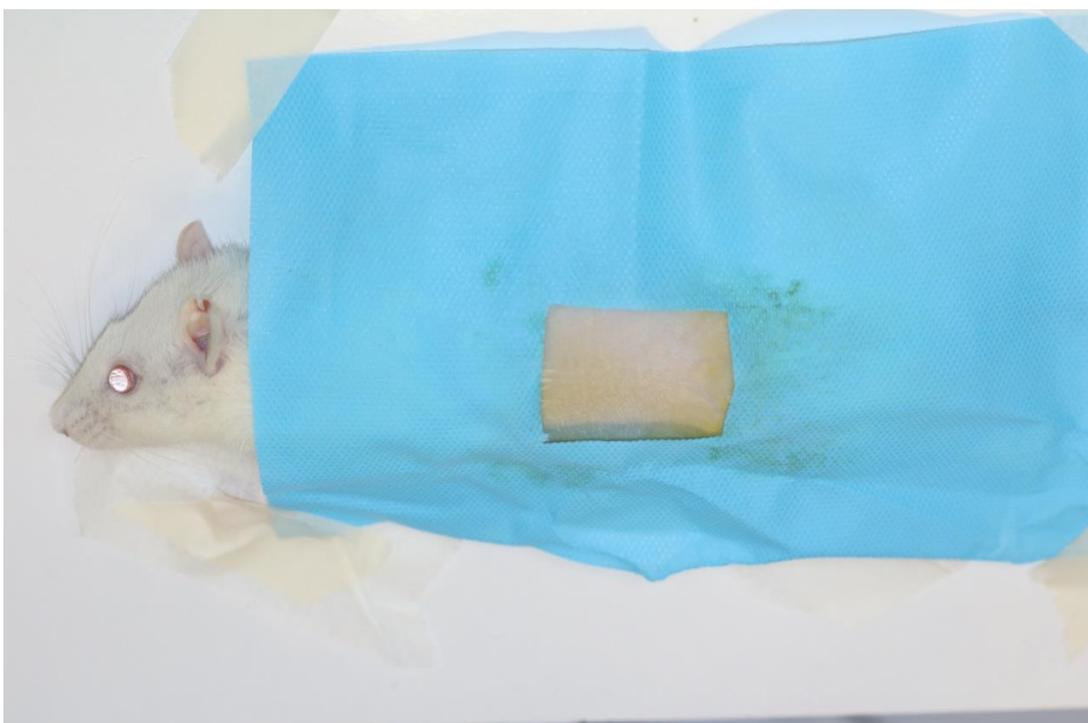


Figura 2 – Preparação pré-cirúrgica: a) assepsia; b) campo operatório

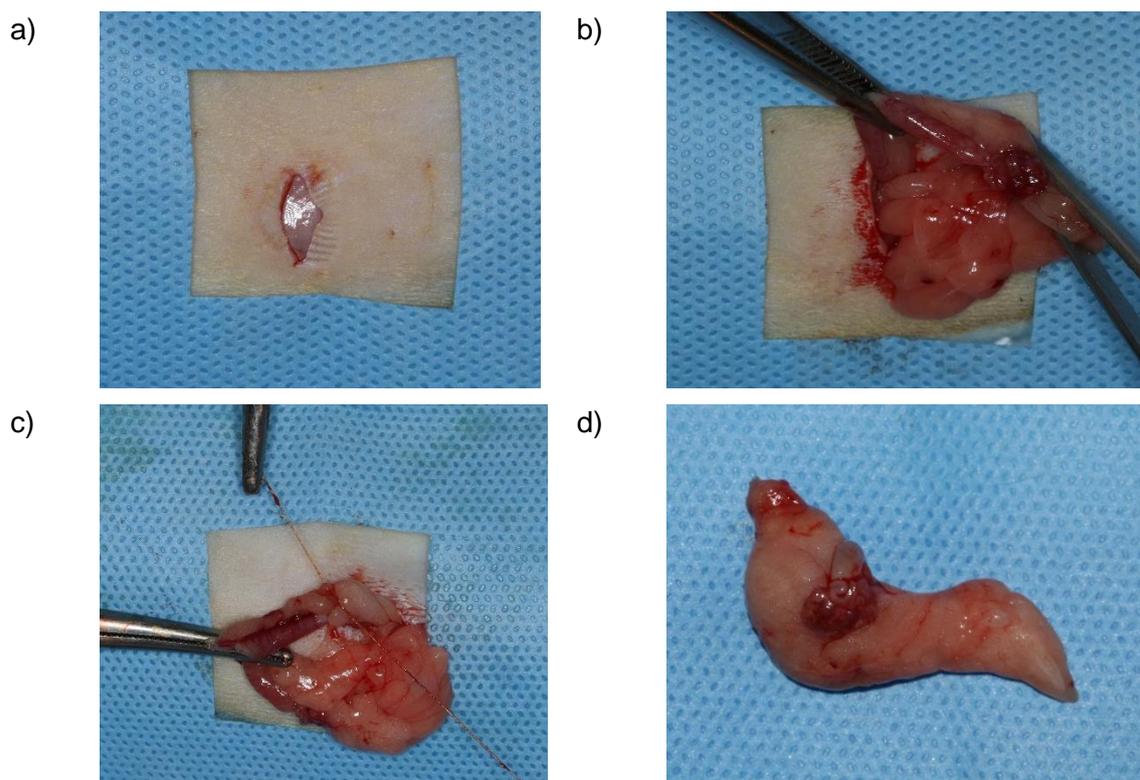


Figura 3 – Ovariectomia: a) incisão; b) exposição do ovário; c) amarilha e excisão do ovário; d) parte do útero e tecido retirado.

Após a cirurgia, os animais permaneceram sob observação e foram posicionados em local aquecido para prevenção de hipotermia até a completa recuperação da anestesia geral. No pós-operatório todos os animais foram medicados com anti-inflamatório cetoprofeno (Ketojet) na dose 5mg/Kg, via de administração subcutânea, 1 x ao dia, e com analgésico dipirona sódica (D-500) na dose 200mg/Kg, via de administração subcutânea, durante 3 dias após o procedimento cirúrgico.

3.4 Cirurgia de simulação de ovariectomia

Nos grupos controle, os animais receberam cirurgia de simulação de ovariectomia, ou falsa ovariectomia (*Sham*), em que todos procedimentos acima foram realizados nas mesmas condições descritas, incluindo a

exposição dos ovários, exceto pela sutura de ligadura das trompas e a remoção dos mesmos. (Figura 4)

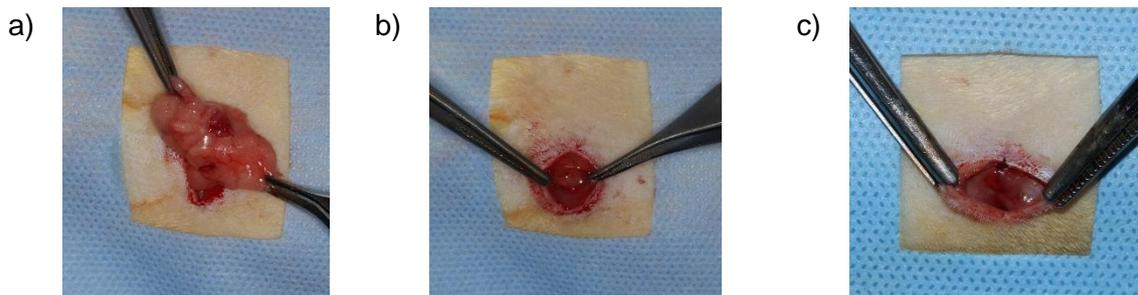


Figura 4 – Cirurgia de simulação de Ovariectomia: a) exposição do ovário; b) recolocação no interior do abdômen; c) sutura peritônio.

3.5 Medicação

Após 22 semanas da realização da cirurgia de ovariectomia e posterior a primeira etapa do exame de densitometria, o tratamento com bisfosfonatos foi realizado nos grupos A. O medicamento foi administrado na forma forçada com agulha de gavagem curva para rato de ponta romba com auxílio de apreensão manual para uma maior precisão da dosagem (Figura 5). O grupo OVXA+RIS recebeu a administração sistêmica do risedronato sódico na forma diluída em soro fisiológico, na dose de 2,5mg/Kg de peso corporal, a cada 72h por via oral por meio de gavagem, por um período de quatro semanas. Nos grupos sem exposição sistêmica de bisfosfonatos, grupos Controle A e OVX A, foi administrado o mesmo volume de substância de soro fisiológico como medicação placebo.



Figura 5 – Apreensão manual e gavagem para administração do medicamento.

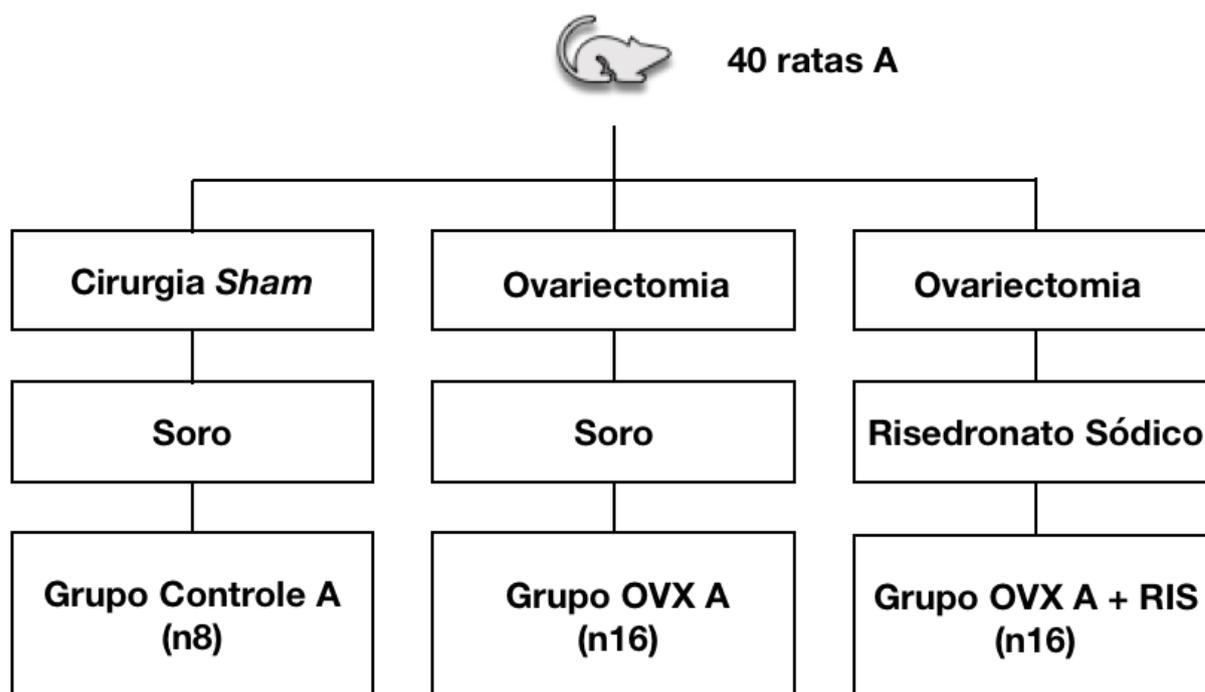


Figura 6 - Divisão dos grupos experimentais A para a realização do tratamento.

3.6 Densitometria

A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada pelo método de absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA) pelo aparelho Lunar Prodigy Advance (GE Healthcare, Alemanha) devidamente calibrado diariamente. Utilizou-se o equipamento programado com o *software* para aquisição de imagem em pequenos animais, a captura da imagem foi realizada por um profissional capacitado experiente em densitometria óssea em humanos.

Para a aquisição, as ratas foram anestesiadas com a associação da solução de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin) e cloridrato xilazina 2% (Xilazin), dose de 100mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente, por via intraperitoneal. Os animais foram posicionados na posição supina paralela ao eixo longitudinal da mesa do aparelho com os membros afastados do corpo, cabeça, tronco e cauda alinhados. Aquisição da imagem do corpo inteiro foi iniciada com cerca de 2,5 cm acima do topo da cabeça e terminou ao final do terço médio da cauda.

À medida que a aquisição ocorria, a imagem processada era gradualmente exibida na tela de monitor do computador, possibilitando a visualização pelo operador da necessidade de ajustes na posição do animal e nova captura para correta aquisição do exame.

A aquisição da imagem dos animais dos Grupos Controle A, OVXA e OVXA+RIS foi realizada em 2 momentos, primeira etapa com 10 semanas após a cirurgia de ovariectomia e a segunda com 32 semanas após o início da medicação com bisfosfonatos. Nos grupos Controle B e OVXB a densitometria foi realizada somente ao final do experimento com 12 meses após a cirurgia de ovariectomia.

3.7 Análise Densidade Mineral Óssea

Após o exame por DXA, foi realizada a avaliação da composição óssea e tecidual de todas as ratas do experimento. A análise foi realizada através de um *software* de densitometria de pequenos animais na plataforma enCORE no Windows do sistema Lunar Prodigy Advance (GE Healthcare, Alemanha) (Figura 7) um mesmo profissional certificado e experiente. A análise completa e seleção de pontos de interesse foram posicionados nas regiões de cabeça, perna direita, coluna e pelve. Os dados dos resultados foram executados pelo *software* do aparelho e encaminhados para impressão em papel. Os parâmetros medidos nesse estudo incluíram a densidade mineral óssea (DMO) em g/cm² das regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total.

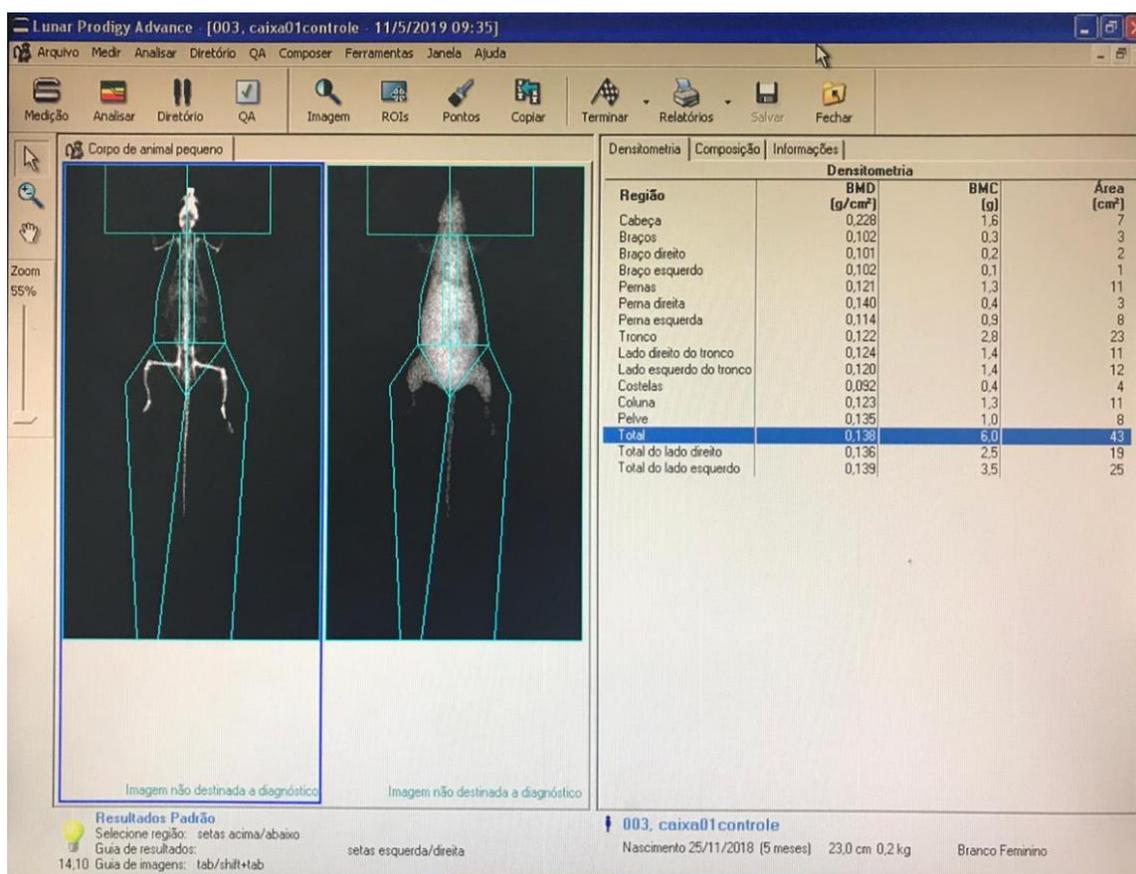


Figura 7 – Seleção dos pontos de interesse

4. Resultados

4.1 Análises dos grupos A

4.1.1 Hipóteses nulas

H0: Não há variação entre os grupos quanto a densidade mineral óssea.

H0: Não há diferença entre os tempos (T1 e T2) quanto a densidade mineral óssea.

H0: Não há diferença entre os grupos quanto a variação na densidade mineral óssea entre o os tempos T1 e T2.

4.1.2 Metodologia da análise estatística

Primeiramente foram realizadas análises descritivas e exploratórias dos dados. A análise exploratória indicou que os dados não atendem as pressuposições de uma análise paramétrica, foram então utilizados os testes não paramétricos de Krukal Wallis e Dunn para as comparações entre os grupos e Wilcoxon para as comparações entre os tempos. Todas as análises foram realizadas no programa R com nível de significância de 5%.

4.1.3 Resultados Grupos A

Na Tabela 1 e Figuras 8 a 12 são apresentados os resultados da densidade mineral óssea em função do grupo e do tempo. Pode-se observar que nos três grupos houve aumento estatisticamente significativo da densidade no tempo 2 (Final) em relação ao tempo 1 (10 semanas após a cirurgia), nas regiões da cabeça, coluna e total ($p < 0,05$). Na região da pelve houve aumento significativo no grupo controle e no grupo com administração sistêmica de bisfosfonatos ($p < 0,05$). No tempo 1 na região da cabeça, o grupo com administração sistêmica de bisfosfonatos apresentou densidade óssea significativamente menor que o grupo controle ($p < 0,05$). Para as demais

regiões não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). No tempo 2 não houve diferença significativa entre os grupos para nenhuma das regiões analisadas e nem para o total ($p>0,05$).

Na Tabela 2 são apresentadas as variações na densidade óssea no tempo 2 em relação ao tempo 1. Observa-se que na região da cabeça todas as ratas dos três grupos tiveram aumento na densidade. O aumento foi significativamente menor nas ratas do grupo controle do que dos demais grupos ($p<0,05$). Na região da pelve, todas (100%) as ratas do grupo controle, 84,6% do grupo de ratas ovariectomizadas e 91,7% do grupo de ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos tiveram aumento na densidade óssea. O aumento na região da pelve foi significativamente menor no grupo de ratas ovariectomizadas do que no grupo de ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos ($p<0,05$). Nas demais regiões não houve diferença significativa entre os grupos quanto a variação na densidade óssea entre os tempos ($p>0,05$).

Tabela 1- Média (desvio padrão), Mediana (valor mínimo e valor máximo) da densidade mineral óssea (DMO) de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo.

Tempo	Região	Controle		OVX		OVX + RIS		p-valor
		Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	
1	Cabeça	0,232 (0,009)	0,231 (0,222-0,244) A	0,221 (0,010)	0,222 (0,203-0,240) AB	0,217 (0,008)	0,216 (0,205-0,230) B	0,0140
	Perna	0,144 (0,005)	0,142 (0,139-0,152) A	0,147 (0,009)	0,145 (0,135-1,65) A	0,145 (0,009)	0,140 (0,136-0,165) A	0,8217
	Coluna	0,128 (0,007)	0,130 (0,116-0,136) A	0,128 (0,006)	0,129 (0,114-0,137) A	0,126 (0,008)	0,122 (0,114-0,143) A	0,4921
	Pelve	0,137 (0,008)	0,136 (0,126-0,148) A	0,139 (0,008)	0,137 (0,126-0,153) A	0,133 (0,007)	0,133 (0,124-0,146) A	0,2185
	Total	0,143 (0,005)	0,141 (0,138-0,149) A	0,143 (0,006)	0,144 (0,134-0,150) A	0,141 (0,005)	0,139 (0,136-0,151) A	0,5831
2	Cabeça	0,252 (0,015)	*0,249 (0,232-0,276) A	0,273 (0,029)	*0,272 (0,231-0,325) A	0,272 (0,018)	*0,272 (0,242-0,304) A	0,0940
	Perna	0,151 (0,010)	0,153 (0,131-0,163) A	0,150 (0,007)	0,149 (0,139-0,164) A	0,150 (0,011)	0,149 (0,136-0,169) A	0,9092
	Coluna	0,142 (0,013)	*0,144 (0,118-0,158) A	0,144 (0,012)	*0,142 (0,126-0,167) A	0,145 (0,008)	*0,147 (0,133-0,160) A	0,7969
	Pelve	0,153 (0,009)	*0,151 (0,141-0,168) A	0,146 (0,010)	0,143 (0,136-0,168) A	0,149 (0,008)	*0,147 (0,137-0,160) A	0,1742
	Total	0,156 (0,009)	*0,155 (0,140-0,168) A	0,157 (0,010)	*0,153 (0,144-0,179) A	0,158 (0,006)	*0,160 (0,145-0,165) A	0,6582

Controle= ratas com cirurgia *Sham*; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final. *Difere da medida do mesmo grupo na mesma região no tempo de 10 semanas após a cirurgia. Letras distintas na horizontal indicam diferenças estatisticamente significativas

Comparação entre os tempos:

$p(\text{Cabeça} - \text{grupo controle}) = 0,0180$; $p(\text{Perna} - \text{grupo controle}) = 0,1159$; $p(\text{Coluna} - \text{grupo OVX}) = 0,0280$; $p(\text{Pelve} - \text{grupo controle}) = 0,0180$; $p(\text{Total} - \text{grupo controle}) = 0,0180$

$p(\text{Cabeça} - \text{grupo OVX}) = 0,0157$; $p(\text{Perna} - \text{grupo OVX}) = 0,3279$; $p(\text{Coluna} - \text{grupo OVX}) = 0,0157$; $p(\text{Pelve} - \text{grupo OVX}) = 0,1080$; $p(\text{Total} - \text{grupo OVX}) = 0,0157$

$p(\text{Cabeça} - \text{grupo OVX} + \text{RIS}) = 0,0231$; $p(\text{Perna} - \text{grupo OVX} + \text{RIS}) = 0,7007$; $p(\text{Coluna} - \text{grupo OVX} + \text{RIS}) = 0,0231$; $p(\text{Pelve} - \text{grupo OVX} + \text{RIS}) = 0,0277$; $p(\text{Total} - \text{grupo OVX} + \text{RIS}) = 0,0231$

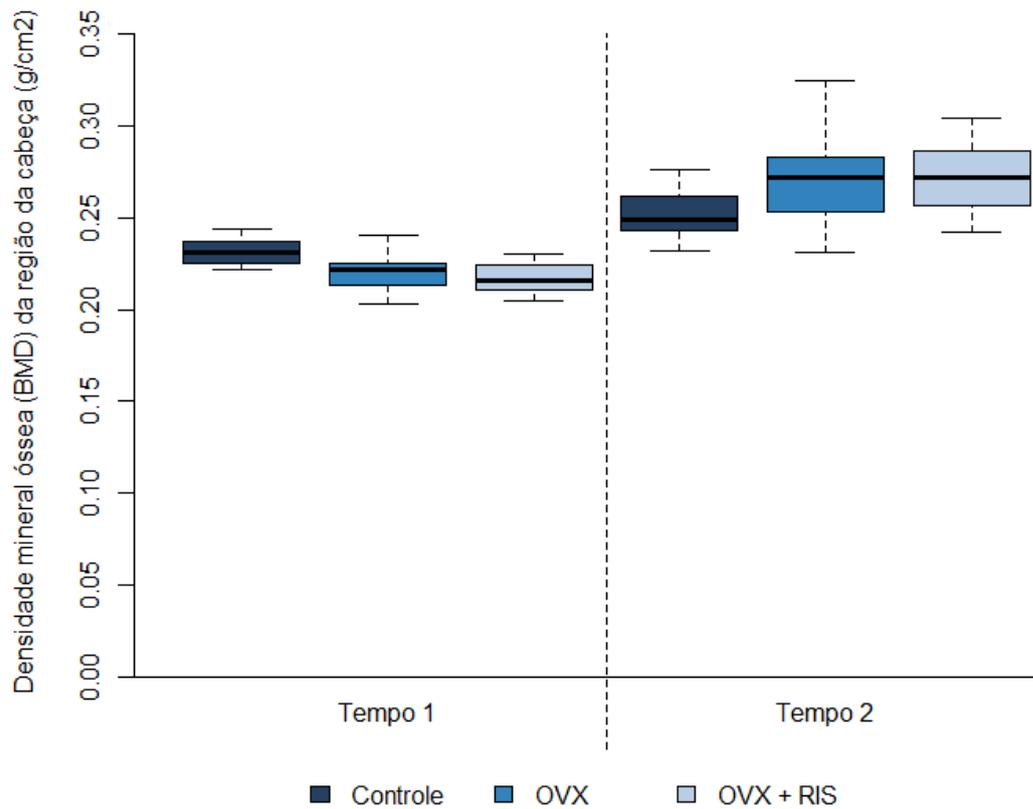


Figura 8 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da cabeça (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

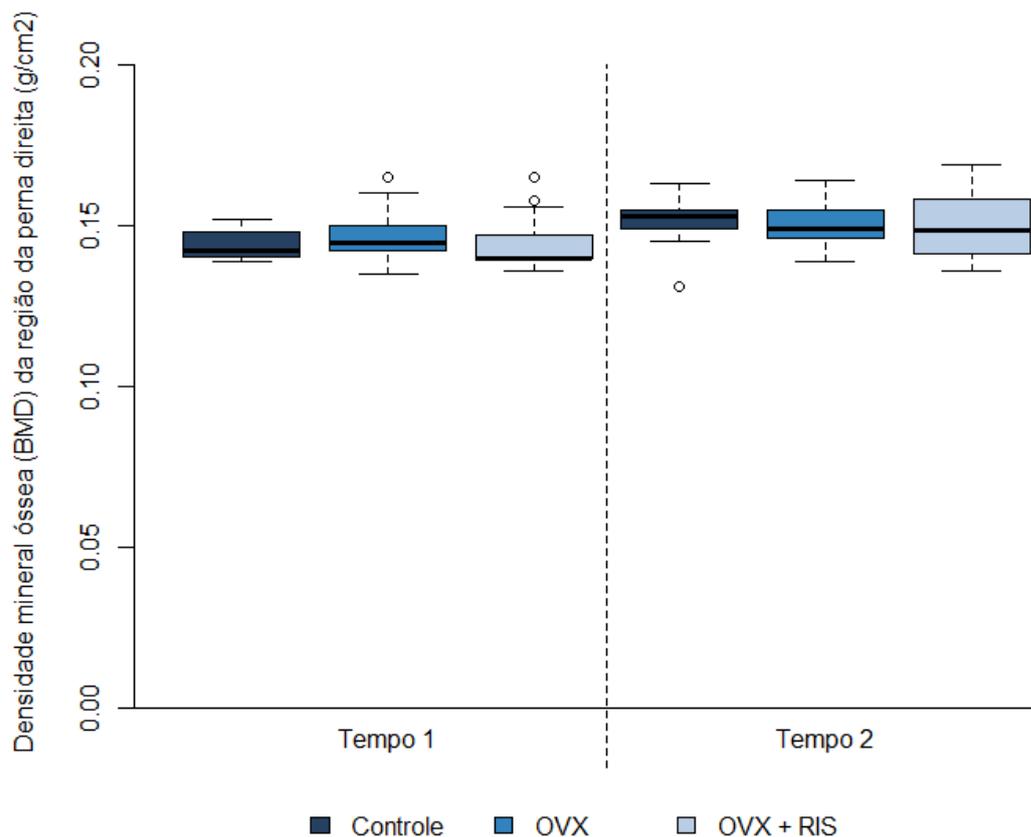


Figura 9 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da perna direita (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia *Sham*; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

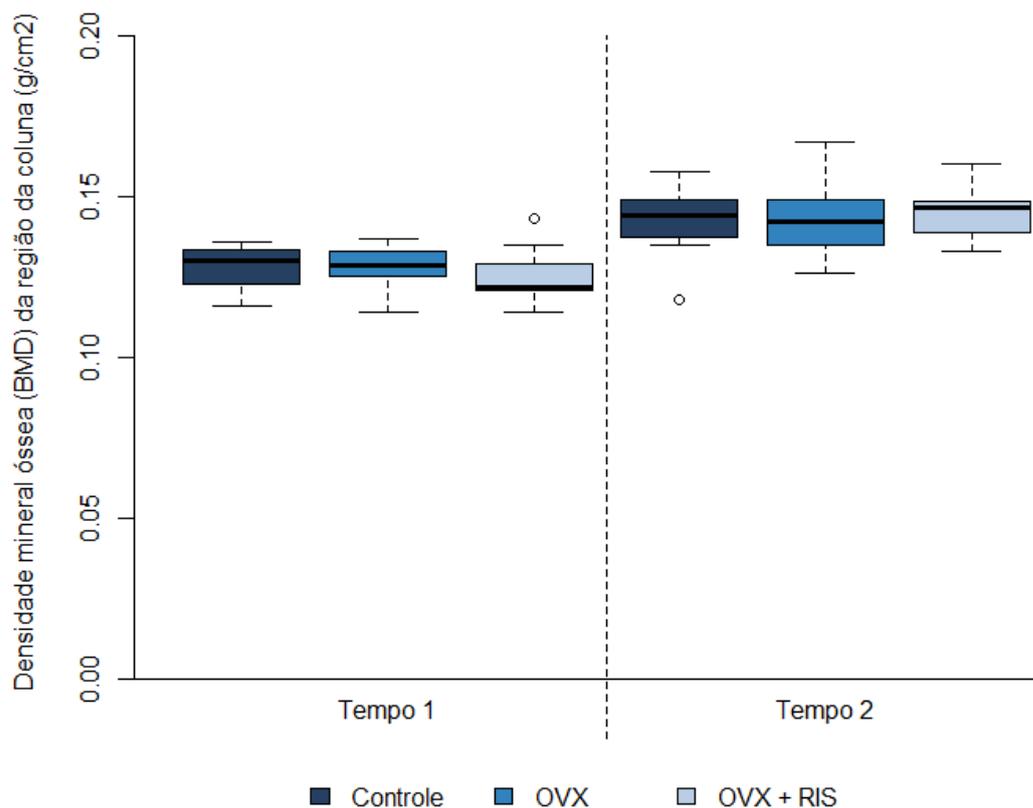


Figura 10 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da coluna (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

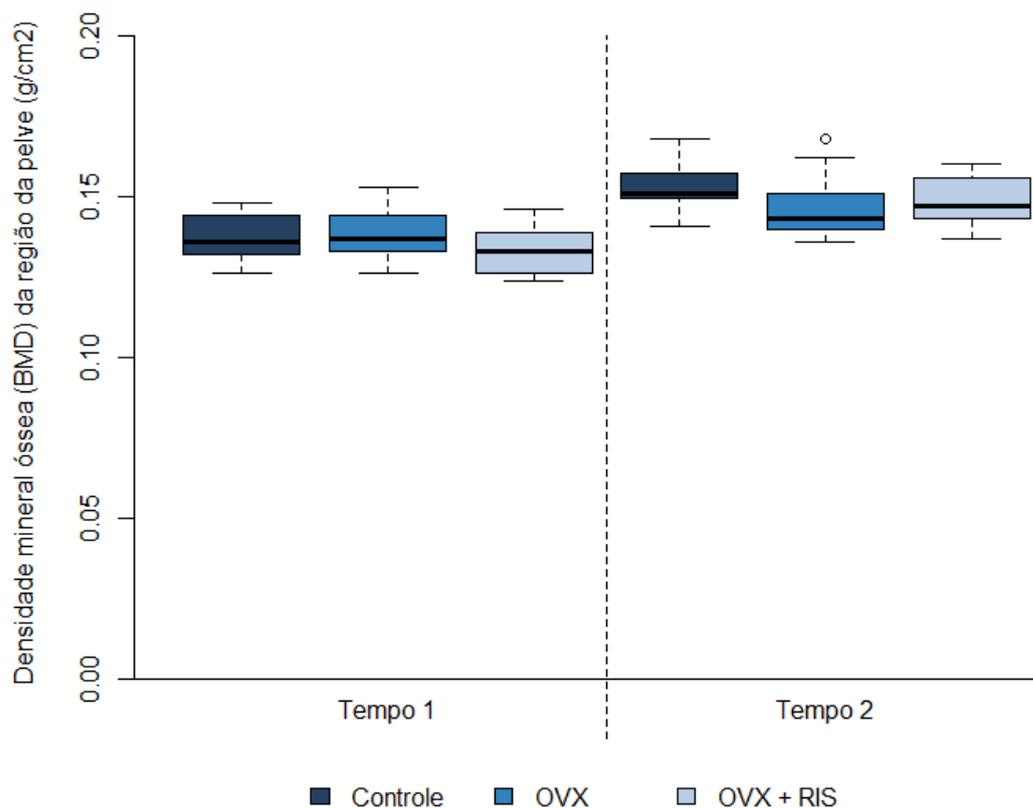


Figura 11 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da pelve (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

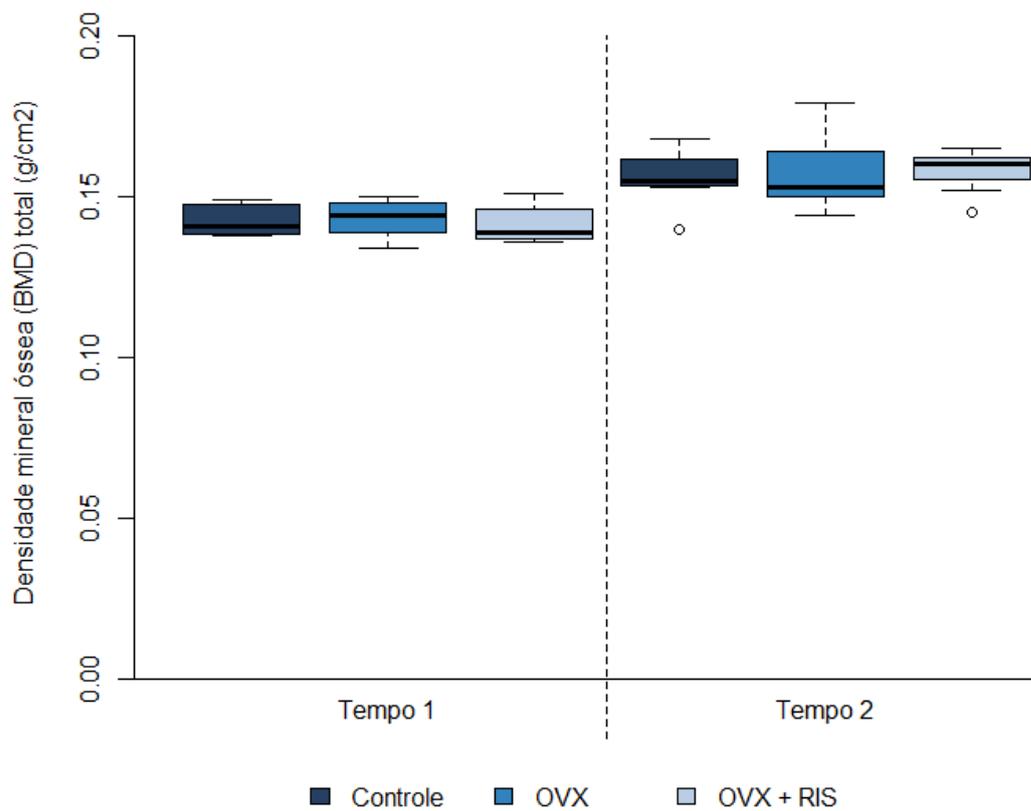


Figura 12 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) total (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo. Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Tempo 1=10 semanas após a cirurgia; Tempo 2= Final.

Tabela 2 - Média (desvio padrão), Mediana (valor mínimo e valor máximo) da variação na densidade mineral óssea (DMO) no tempo 2 (Final) em relação ao tempo 1 (10 semanas após a cirurgia), de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total (g/cm²) em função do grupo (grupos A) e do tempo.

Região	Controle		Ratas com aumento	Ratas com diminuição	OVX		Ratas com aumento	Ratas com diminuição	OVX + RIS		Ratas com aumento	Ratas com diminuição	p-valor
	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	n (%)	n (%)	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	n (%)	n (%)	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	n (%)	n (%)	
Cabeça	0,021 (0,010)	0,023 (0,004-0,032) B	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0,052 (0,029)	0,056 (0,008-0,102) A	13 (100,0%)	0 (0,0%)	0,055 (0,015)	0,057 (0,026-0,084) A	12 (100,0%)	0 (0,0%)	0,0122
Perna	0,006 (0,010)	0,006 (-0,009-0,021) A	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,003 (0,007)	0,003 (-0,014-0,016) A	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,006 (0,016)	0,006 (-0,024-0,033) A	7 (58,3%)	5 (41,7%)	0,7284
Coluna	0,014 (0,010)	0,015 (-0,005-0,025) A	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,015 (0,011)	0,014 (-0,002-0,038) A	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0,021 (0,010)	0,021 (-0,001-0,035) A	11 (91,7%)	1 (8,3%)	0,1860
Pelve	0,016 (0,008)	0,017 (0,005-0,027) AB	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0,006 (0,012)	0,007 (-0,017-0,023) B	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,017 (0,010)	0,020 (-0,003-0,029) A	11 (91,7%)	1 (8,3%)	0,0359
Total	0,013 (0,007)	0,014 (0,002-0,021) A	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0,013 (0,009)	0,009 (-0,002-0,030) A	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0,0018 (0,007)	0,017 (0,006-0,028) A	12 (100,0%)	0 (0,0%)	0,2252

Controle= ratas com cirurgia *Sham*; OVX= ratas ovariectomizadas; OVX + RIS= ratas ovariectomizadas com administração sistêmica de bisfosfonatos. Letras distintas na horizontal indicam diferenças estatisticamente significativa

4.2 Análises dos grupos B

4.2.1 Hipóteses nulas

H0: Não há variação entre os grupos quanto a densidade mineral óssea.

4.2.2 Metodologia da análise estatística

Primeiramente foram realizadas análises descritivas e exploratórias dos dados. A análise exploratória indicou que os dados não atendem as pressuposições de uma análise paramétrica, foi então utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney para as comparações entre os dois grupos. Todas as análises foram realizadas no programa R com nível de significância de 5%.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

4.2.3 Resultados dos grupos B

Na Tabela 3 e Figuras 13 a 17 são apresentados os resultados de densidade mineral óssea em função do grupo. Não houve diferença significativa na densidade óssea entre o grupo de ratas ovariectomizadas e o grupo controle (ratas com cirurgia Sham), para nenhuma das regiões avaliadas ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Média (desvio padrão) da densidade mineral óssea (DMO) de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total (g/cm²) em função do grupo (grupos B).

Região	Controle		OVX		p-valor
	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	Média (desvio padrão)	Mediana (mínimo e máximo)	
Cabeça	0,255 (0,019)	0,256 (0,223-0,276)	0,268 (0,018)	0,268 (0,243-0,308)	0,1270
Perna	0,151 (0,011)	0,150 (0,135-0,170)	0,154 (0,009)	0,155 (0,137-0,172)	0,4333
Coluna	0,134 (0,012)	0,133 (0,121-0,154)	0,139 (0,010)	0,138 (0,119-0,158)	0,3535
Pelve	0,145 (0,011)	0,146 (0,123-0,159)	0,146 (0,009)	0,144 (0,124-0,162)	0,9015
Total	0,152 (0,008)	0,156 (0,139-0,161)	0,155 (0,006)	0,156 (0,140-0,167)	0,5499

Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

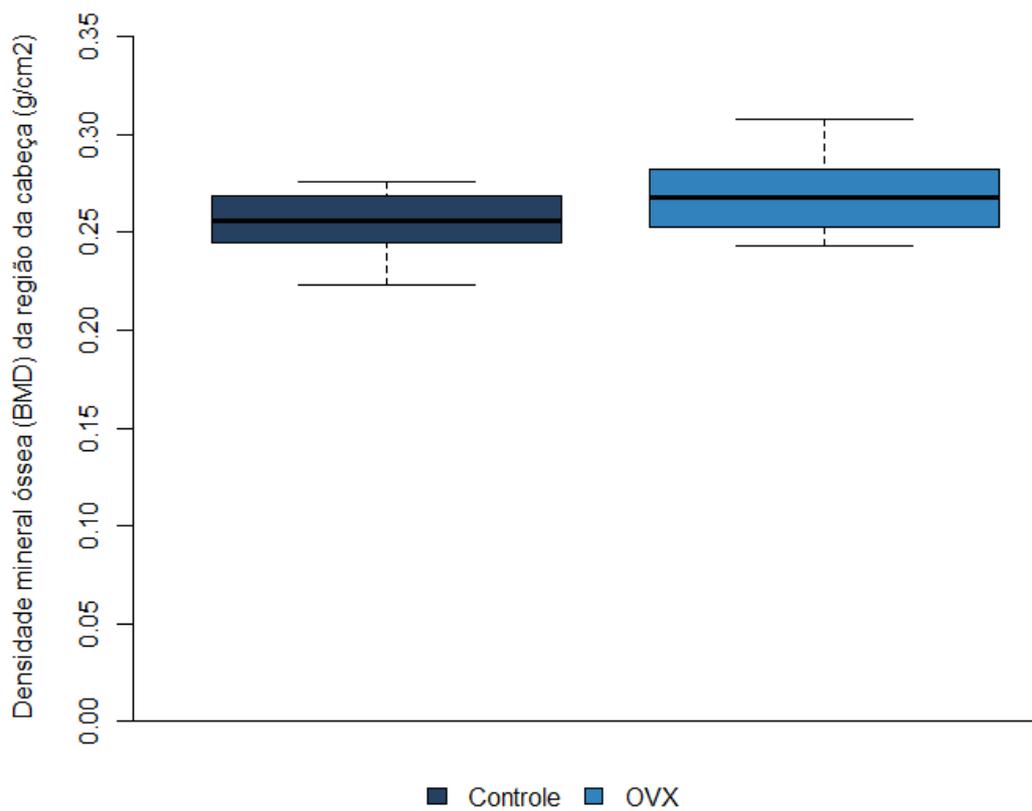


Figura 13 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da cabeça (g/cm²) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

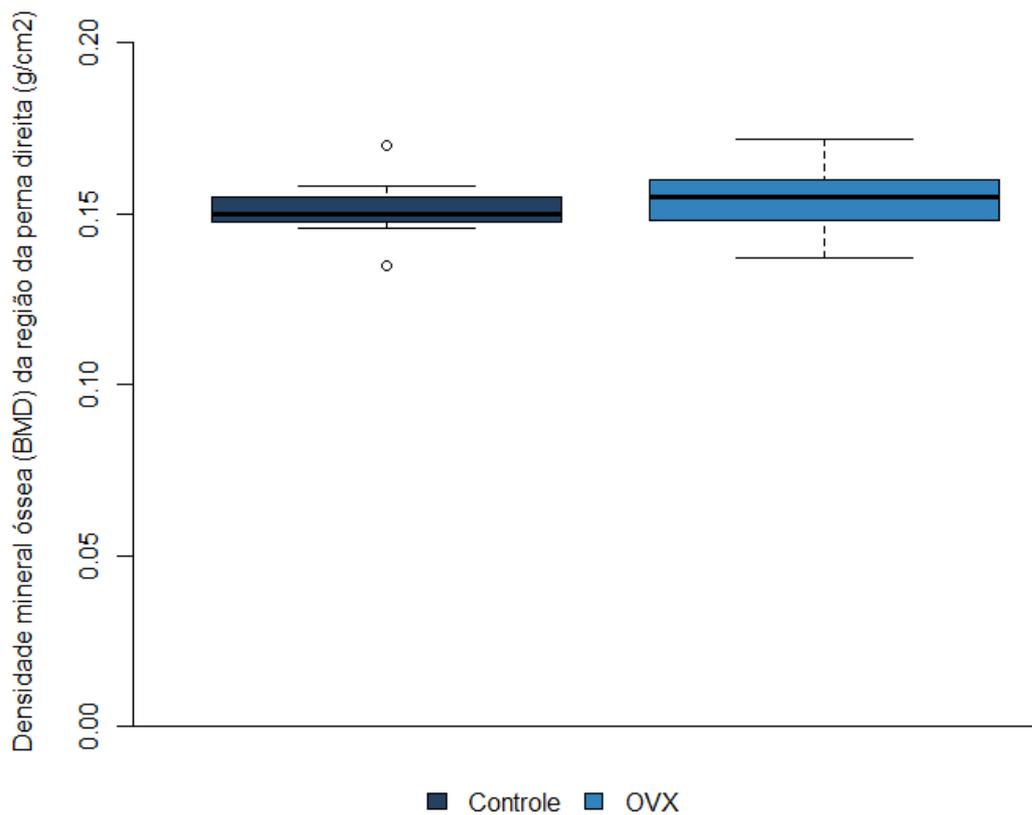


Figura 14 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da perna direita (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

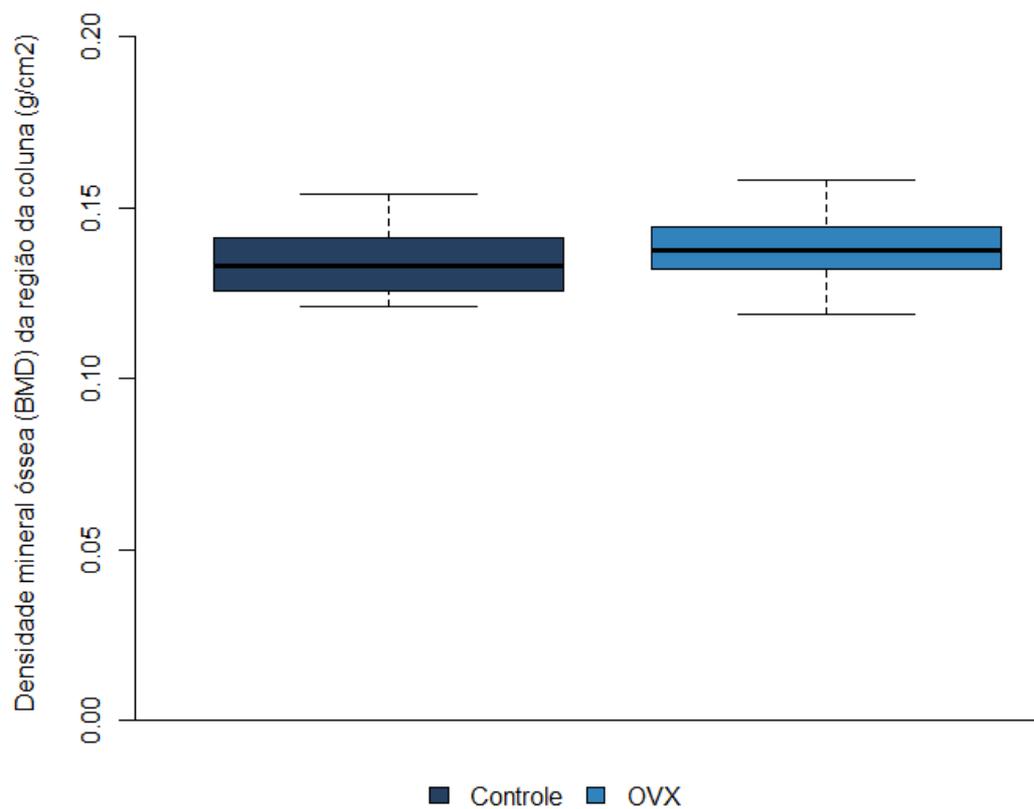


Figura 15 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da coluna (g/cm²) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

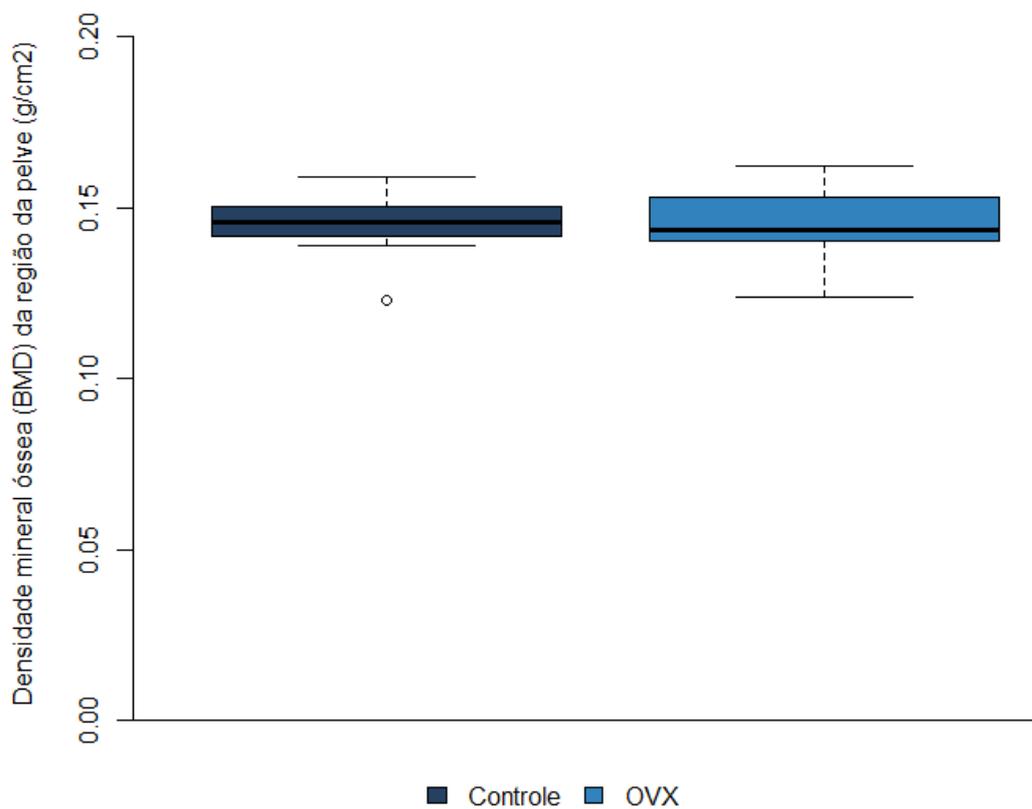


Figura 16 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da pelve (g/cm²) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

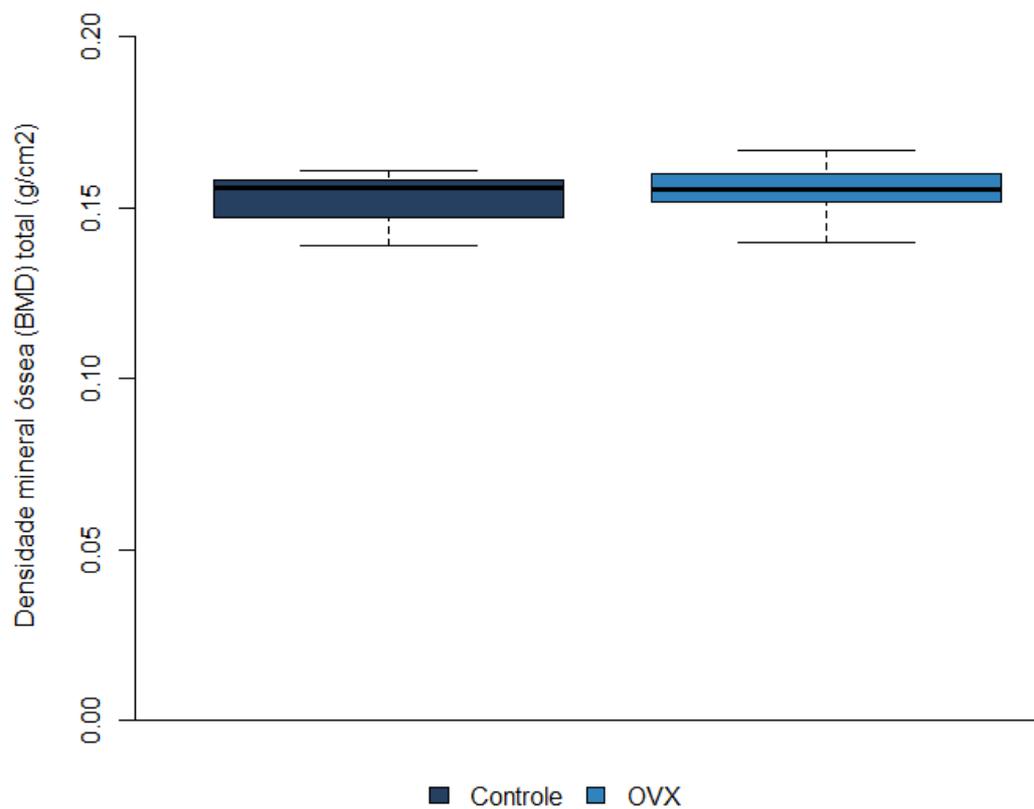


Figura 17 - Box plot da densidade mineral óssea (DMO) da região da pelve (g/cm^2) em função do grupo (grupos B). Controle= ratas com cirurgia Sham; OVX= ratas ovariectomizadas.

5. Discussão

Pela análise dos resultados, o presente estudo realizou densitometria óssea em todos os grupos para análise de alterações na densidade mineral óssea (DMO) de regiões de cabeça, perna direita, coluna, pelve e total. Foi verificado um aumento da densidade mineral óssea total nos grupos controle A, ovariectomizado A e ovariectomizado A com a administração sistêmica de bisfosfonatos. Além disso, esse aumento na densidade mineral foi observado nas regiões de cabeça e coluna em todos os três grupos A. Na região da pelve, o aumento significativo da densidade foi encontrado em 100% do grupo controle A, 84,6% no grupo ovariectomizado A e 91,7% do grupo ovariectomizado B com administração sistêmica de bisfosfonatos.

Após dez semanas da data da cirurgia de ovariectomia, na região de cabeça, o grupo com administração sistêmica de bisfosfonatos apresentou densidade óssea menor que o grupo controle. Na região da cabeça, todas as ratas dos três grupos tiveram aumento na densidade óssea. Com o aumento significativamente menor nas ratas do grupo controle do que nas ratas dos demais grupos. Por outro lado, nos grupos B, não houve diferença estatística na densidade entre o grupo de ratas ovariectomizadas e o grupo controle para todas as regiões avaliadas.

A osteoporose é um problema de saúde muito relacionado ao surgimento de fraturas ósseas, que na maioria dos casos resultam na grave incapacidade motora do indivíduo. (POPOVIĆ et al., 2016) Os modelos animais de osteoporose são considerados confiáveis pois mimetizam a perda de massa óssea e possibilitam o aprimoramento de testes e o desenvolvimento novas terapias no estudo dessa doença. Em estudos de osteoporose é esperado que os animais se tornem osteopênicos ou percam a massa óssea após ovariectomia, devido à relação da osteoporose humana com a depleção de estrogênio. (KIMMEL, 2001)

De acordo com Egermann e colaboradores (2005), a diminuição relativa da densidade mineral óssea devido a ovariectomia é menor em ratas do que em humanos osteoporóticos. Os valores para as reduções na densidade mineral óssea encontrados em estudos em animais são difíceis de comparar, porque diferem nos

métodos e nos valores fornecidos por diferentes tipos de equipamentos (absorptometria de raios x de dupla energia [DEXA]). (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005) (ZHANG et al., 2009)

Este trabalho foi realizado com o intuito avaliar as alterações da densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas. A cirurgia de remoção dos ovários de ratas fêmeas com idade aproximada de dez semanas foi realizada com a intenção de promover a depleção da produção do hormônio estrogênio. A diminuição do estrogênio no organismo permite um desgaste acelerado da massa óssea. (TURNER, 2001) A maioria dos modelos de osteoporose são realizados em ratas fêmeas sexualmente maduras com pelo menos três meses de idade, podendo variar para menos. (POPOVIĆ et al., 2016) Estudos sobre reparação óssea e qualidade óssea têm utilizado amostras de três meses de idade. (PENG et al., 1997) (WALSH et al., 1997)(CAO et al., 2002) (TIVESTEN et al., 2004)

Ratas jovens, com aproximadamente 3 meses de idade apresentam efeitos da ovariectomia após quatro semanas da data da cirurgia, com perdas ósseas com características semelhantes às de ratas na idade senil. (KALU, 1991) Estudos apontam que ovariectomia em ratas em fase de crescimento promove uma maior perda óssea e em maior magnitude comparada à realizada em ratas adultas. Além disso, a cirurgia na idade de três meses é recomendada para indução de osteoporose e recomendam que estudos com agentes potencialmente terapêuticos sejam realizados por não mais que seis meses de duração após ovariectomia. (WRONSKI et al., 1989) (THOMPSON et al., 1995)

De acordo com o estudo Heiss e colaboradores (2012), após 14 meses da cirurgia de ovariectomia, a osteoporose grave foi estabelecida em ratas que fizeram ovariectomia associada a deficiência nutricional de cálcio. A diminuição na taxa da DMO ocorreu em um percentual de 40% nesse grupo. O estudo concluiu também a correlação na proporção de alteração da DMO em relação ao tempo da realização da cirurgia de ovariectomia. Apresentando o aumento da DMO em até 12 meses após da realização da ovariectomia de ratas ovariectomizadas e posteriormente a diminuição da DMO com a perda gradual da área óssea a partir de 14 meses após a cirurgia. Isso indica que a osteoporose senil foi atingida e simulada em ratas

ovarietomizadas após 14 meses da cirurgia de ovariectomia nesse estudo. (SCHLIEFKE et al., 2013) Esse estudo corrobora com os achados deste trabalho, em que ocorreu com o aumento da taxa de DMO até 12 meses após a cirurgia de ovariectomia. Concluindo a necessidade de aumentar o período de análise a partir de 12 meses após a ovariectomia para a comprovação da diminuição dos valores DMO em DXA e estabelecer a osteopenia.

Roedores são os principais animais utilizados em modelo animal para indução de osteoporose. A literatura tem relatado o uso de diferentes linhagens, sendo as mais comuns *Wistar* (HADDAD; SALAZAR; HERNANDES, 2015) (AMMANN et al., 1992) (VASCONCELLOS; SABINO; PETROIANU, 2005) (JEE; YAO, 2001) e *Sprague-Dawley* (SHEN et al., 2017)(SMITH et al., 2014) (SAKATA et al., 2018). Para a realização desse estudo foram utilizadas ratas *Wistar* a partir da remoção cirúrgica bilateral dos ovários. Segundo Leonavas et al, (2008), a ovariectomia em roedores é uma técnica bem estabelecida na literatura em que as alterações ósseas encontradas são semelhantes às alterações encontradas na osteoporose pós-menopausa em humanos. Os modelos animais de osteoporose são considerados confiáveis pois mimetizam a perda de massa óssea e possibilita o aprimoramento de testes e o desenvolvimento novas terapias no estudo da doença. (LELOVAS et al., 2008)

Nesse estudo, as alterações na densidade óssea não ocorreram de forma igual nas áreas analisadas. Portanto, nem todos os locais analisados apresentaram uma perda óssea, reforçando ainda mais o paralelo do esqueleto do rato e do humano, uma vez que as fraturas por fragilidade osteoporótica e a osteopenia são limitadas a alguns locais em humanos. (KIMMEL, 2001) Atualmente, a absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA) é o estado da arte para medir a massa óssea em humanos, também pode ser facilmente aplicada em ratos. (AMMANN et al., 1992)(GRIFFIN et al., 1993)(MITLAK; SCHOENFELD; NEER, 1994)(KIMMEL; WRONSKI, 1990)(SHEN et al., 2017)

A cirurgia de ovariectomia pode ser realizada por incisões ventrais ou dorsais. De acordo com a literatura, o tempo da execução da cirurgias realizadas na região ventral pode variar até dez minutos, porém como o trato gastrointestinal é

manipulado (SANKAR et al., 2014) e a taxa de mortalidade nas primeiras 24h é considerada alta (30%), o procedimento dessa maneira muitas vezes não é indicado. O método de escolha para cirurgia de ovariectomia é a partir de incisões dorsais, que podem ser executadas por uma incisão mediana com cerca de 3cm ou duas incisões dorsolaterais com cerca de 1cm. (YOUSEFZADEH et al., 2020). A metodologia cirúrgica empregada neste estudo foi a utilização de duas incisões dorso laterais realizadas em um tempo cirúrgico aproximado de 20 minutos. O tempo da cicatrização da ferida cirúrgica foi de 10 dias, semelhante aos estudos da literatura.

Neste estudo, após a cirurgia de ovariectomia uma rata do grupo Controle A, três ratas do grupo OVXA + RIS, duas ratas do grupo OVX A, uma do grupo Controle B e quatro do OVXB vieram a óbito por complicações pós-cirúrgicas. As perdas ocorreram tanto por ruptura dos pontos, hemorragia e bem como por septicemia tardia. Os fios de nylon utilizados na sutura da pele têm como características uma maior memória o que ocasiona na dificuldade de dar nós e mantê-los com tensão em suturas delicadas. Portanto, para a diminuir a perda de amostra por ruptura dos pontos, foi estabelecido no decorrer do experimento que ao finalizar a sutura a distância necessária entre o corte do fio e a sutura de pelo menos dois centímetros e meio. A utilização de antibiótico terapia profilática em dose única no dia da cirurgia poderia ser uma alternativa na diminuição da amostra por complicações pós-cirúrgicas.

Uma rata em cada grupo Controle A e OVXA+RIS e duas ratas no grupo OXA faleceram após o exame de densitometria inicial em decorrência da anestesia geral e deslocamento ao equipamento. Apesar do exame DXA ser rápido, seguro, indolor e de tempo rápido. Para o correto posicionamento dos animais na mesa do equipamento foi necessária a contenção do corpo e patas na posição supina após a anestesia geral. Apesar da acurácia do exame de densitometria ser correlacionado à posição da paciente alinhada a mesa do equipamento, estudo demonstrou que não houve diferença referente a aquisição de imagem pelo aparelho DEXA na posição supina ou na posição prona. (TURNER, 2001)

O ganho de peso de ratas que foram submetidas à cirurgia de ovariectomia pode resultar no ganho da massa óssea devido ao crescimento da carga mecânica, resultando na proteção dos animais ovariectomizados contra a diminuição da força óssea relacionada ao aumento da idade. Portanto, muitas vezes as alterações ósseas em estudos de carga mecânica com ratas ovariectomizadas são classificadas como osteopenia e não como osteoporose. (PENG et al., 1997)

O bisfosfonato risedronato, nas condições estudadas, apresentou influência na densidade mineral óssea por DXA. Na região da pelve houve um aumento significativo da densidade nos grupos Controle A e Ovariectomizado com a administração sistêmica de risedronato comparado ao grupo com medicação placebo. O aumento da densidade óssea na região da pelve foi significativamente menor no grupo de ratas ovariectomizadas do que no grupo de ratas ovariectomizadas com administração de bisfosfonatos. Neste trabalho, após a cirurgia de ovariectomia, as ratas apresentaram características similares à perda óssea pós-menopausa em mulheres. Uma fase inicial de perda óssea seguida por uma fase mais lenta e resposta terapêutica óssea similar com o uso de bisfosfonatos. (KALU, 1991) (WANG et al., 2012) (SUGIE-OYA et al., 2016)

Neste trabalho, o tempo de espera entre a cirurgia e o sacrifício dos animais foi de 50 semanas, prazo esse considerado na literatura como suficiente para o estabelecimento da osteoporose. No entanto, o tempo necessário para perda do volume ósseo pode variar de acordo a região a ser analisada. Em 1989, Wronski e colaboradores analisaram a qualidade óssea de vertebrae lombares e tíbias. Após 270 dias da ovariectomia, houve uma perda significativamente diferente entre o volume ósseo da tíbia em comparação ao volume ósseo da vertebra, confirmando que os valores da perda óssea variam de acordo com a região analisada. (WRONSKI et al., 1989)

Na fase de indução de osteoporose por ovariectomia, optou-se por utilizar neste trabalho ratas com cerca de 10 semanas de idade por estarem na fase adulta, por terem atingido a fase reprodutiva e de maturação sexual, dessa maneira, os efeitos da cirurgia de ovariectomia podem ser equiparados aos efeitos que ocorrem em mulheres na menopausa, permitindo uma interpretação dos efeitos da depleção

do estrogênio. Todos os protocolos experimentais de osteoporose podem ser implementados em ratos esqueleticamente imaturos ou maduros. Neste estudo optou-se pela realização da ovariectomia em ratas jovens com cerca de 10 semanas de idade. Esta escolha foi suportada por informações obtidas na literatura para ratas linhagem *Wistar* (MELHUS et al., 2007) e *Sprague-Dawley* (ZHANG et al., 2009)(YISHAKE et al., 2018)(SUGIE-OYA et al., 2016)(LUU et al., 2013)(KRUGER; MOREL, 2016)(GOVINDARAJAN et al., 2013)(NAMKUNG-MATTHAI et al., 2001) Todos os protocolos experimentais de osteoporose podem ser implementados em ratos esqueleticamente imaturos ou maduros. Tendo em vista que os ratos atingem a maturidade sexual aos 2,5 meses, seu esqueleto é considerado maduro após os 10 meses. (ATMACA; AYDIN; MUSAOGU, 2013)

Após 10 semanas da cirurgia de ovariectomia, o exame DXA foi realizado no primeiro momento para os grupos A. De acordo com a literatura, os estudos apontam que o tempo necessário para os métodos que afirmam a eficácia da ovariectomia e o estabelecimento de osteoporose em ratas ovariectomizadas é de 3 meses. (YOUSEFZADEH et al., 2020) Medições sequenciais da DMO por DXA podem ser utilizadas para detectar alterações em curtos períodos. A ovariectomia foi associada a uma DMO significativamente menor em comparação com da DMO da coluna de ratas *Sham* após 4 semanas da cirurgia. (AMMANN et al., 1992)

Neste trabalho, foi realizada a técnica *in vivo* de absorciometria por dupla emissão de raios-x para medir a densidade mineral óssea. As ratas foram anestesiadas com anestesia geral para a realização do procedimento. Ao final do experimento, todos os animais foram eutanasiados pela superdose de anestesia, rapidamente transportados e posicionados no aparelho para a medição da densidade mineral óssea final sem a necessidade de refrigeração das amostras para não ocorrer comprometimento e alterações na análise. De acordo com estudo realizado em ratos obesos, as técnicas *in vivo* e *ex vivo* não apresentaram diferença estatística na DMO. (CHERIF et al., 2018) Em divergência a esse, no estudo realizado com porquinho da índia foi observado diferença estatística nas técnicas *in vivo* e *ex vivo* de DXA. (MAK et al., 2016)

A absorciometria por dupla emissão de raios-x com software para pequenos animais pode ser usada para medir a densidade óssea total e regional em animais tão pequenos quanto os ratos. No entanto, a avaliação da DMO pode ser desafiadora em animais em crescimento. As mudanças aparentes na DMO, medidas pelo DXA em animais em crescimento, são um reflexo do crescimento e tamanho e não a alterações na verdadeira densidade mineral. (LELOVAS et al., 2008)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a osteoporose em humanos é definida com diminuição no *T-score* da densidade mineral óssea. Porém, o uso desta definição da OMS é questionável para modelos animais, uma vez que não há uma pontuação T disponível para parâmetro. Uma diminuição significativa na DMO em estudos longitudinais com animais pode provar a perda óssea após a cessação da função ovariana, mas não implica no desenvolvimento de osteoporose, por exemplo, em termos de uma manifestação clínica, como fraturas espontâneas na coluna vertebral. (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005)

Limitação desse estudo se deve pela impossibilidade afirmar que os animais ovariectomizados adquiriram osteoporose, uma vez que ao realizar o exame DXA, a calibração do equipamento foi com *phantom* antropomórfico utilizado em humanos e não com *phantom* específico para ratos. Como o equipamento não possuía esse recurso para ratos a referência utilizada foi o grupo controle. Dessa forma, podemos extrapolar que as ratas ovariectomizadas adquiriram osteopenia após a cirurgia de ovariectomia.

Embora tenhamos realizado a pesquisa conforme demais trabalhos publicados e seguindo a metodologia proposta, seria importante realizar novos estudos com duração maior que 12 meses após a cirurgia de ovariectomia, permitindo assim a evolução da osteoporose nas amostras, podendo assim, alcançar o entendimento da doença osteoporose em graus mais avançados. Essas propostas podem levar a descobertas de tratamentos ou tratamentos mais eficientes que venham a aliviar a situação dos pacientes portadores da osteoporose em suas formas mais avançadas.

6. Conclusões ou Considerações Finais

A análise dos resultados, sob as condições experimentais utilizadas, possibilitou concluir que houve um aumento da densidade mineral óssea nas regiões de cabeça, coluna e total em todos os grupos. Houve uma diferença dos valores da densidade mineral óssea de acordo com a região analisada. A densidade mineral óssea na região da pelve de ratas submetidas a cirurgia de ovariectomia obteve aumento após a administração sistêmica de bisfosfonatos.

Referências

AMMANN, P. et al. Sequential and precise in vivo measurement of bone mineral density in rats using dual-energy x-ray absorptiometry. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 3, p. 311–316, 1992.

ATMACA, H.; AYDIN, A.; MUSAOGU, R. Experimental model of osteoporosis: Comparison between ovariectomy and botulinum toxin a. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 340–343, 2013.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. and Activation. v. 423, n. May, p. 337–342, 2003.

CAO, Y. et al. 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

CHERIF, R. et al. Dual-energy X-ray absorptiometry underestimates in vivo lumbar spine bone mineral density in overweight rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 36, n. 1, p. 31–39, 2018.

DAPHNE J. THEODOROU*, S. J. T. Dual-energy X-ray absorptiometry in clinical practice: Application and interpretation of scans beyond the numbers. **Clinical Imaging**, v. 26, n. 1, p. 43–49, 2002.

DUQUE, G.; TROEN, B. R. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: New facts for a major geriatric syndrome. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 56, n. 5, p. 935–941, 2008.

EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 16, n. SUPPL. 2, p. 129–138, 2005.

ERIKSEN, E. F.; DÍEZ-PÉREZ, A.; BOONEN, S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: A systematic review. **Bone**, v. 58, p. 126–135, 2014.

FERRETTI, J. L. Perspectives of pQCT technology associated to biomechanical studies in skeletal research employing rat models. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 157–162, 1995.

GALI, J. C. Osteoporose. **ACTA ORTOP BRAS 9(2) - ABR/JUN, 2001**, v. 9, n. 2, p. 3–12, 2001.

GOULDING, A.; GOLD, E. A new way to induce oestrogen-deficiency osteopaenia in the rat: Comparison of the effects of surgical ovariectomy and administration of the LHRH agonist buserelin on bone resorption and composition. **Journal of Endocrinology**, v. 121, n. 2, p. 293–298, 1989.

GOVINDARAJAN, P. et al. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 6, p. 387–398, 2013.

GRIFFIN, M. G. et al. Dual-energy x-ray absorptiometry of the rat: Accuracy, precision, and measurement of bone loss. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 7, p. 795–800, 1993.

GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L. G. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento Osteoporosis: an update in diagnosis and basic treatment principles. v. 39, n. 11, p. 477–485, 2004.

HADDAD, P. T.; SALAZAR, M.; HERNANDES, L. Histomorphometry of the organic matrix of the femur in ovariectomized rats treated with sodium alendronate. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 50, n. 1, p. 100–104, 2015.

HAGUENAUER, D. et al. Anabolic agents to treat osteoporosis in older people: Is there still place for fluoride? Fluoride for treating postmenopausal osteoporosis. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 49, n. 10, p. 1387–1389, 2001.

HARADA, S. I.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349–355, 2003.

JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 3, p. 193–207, 2001.

JI, M.-X.; YU, Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 9–13, 2015.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175–191, 1991.

KIMMEL, D. B. Animal Models for in Vivo Experimentation in Osteoporosis Research. **Osteoporosis**, p. 29–47, 2001.

KIMMEL, D. B.; WRONSKI, T. J. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, v. 46, n. 2, p. 101–110, 1990.

KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 287–294, 2015.

KRUGER, M. C.; MOREL, P. C. H. Experimental Control for the Ovariectomized Rat Model: Use of Sham Versus Nonmanipulated Animal. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 19, n. 1, p. 73–80, 2016.

LELOVAS, P. P. et al. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. v. 58, n. 5, p. 424–430, 2008.

LUU, A. N. et al. Microstructural, densitometric and metabolic variations in bones from rats with normal or altered skeletal states. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–9, 2013.

MAK, I. L. et al. Dual-energy X-ray absorptiometry, peripheral quantitative computed tomography, and micro-computed tomography techniques are discordant for bone density and geometry measurements in the guinea pig. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 266–276, 2016.

MARCHAND, D.; LOSHAK, H. Duration of Bisphosphonate Treatment for Patients with Osteoporosis: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines. **Cadth**, p. 52, 2019.

MELHUS, G. et al. Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rats. **Acta Orthopaedica**, v. 78, n. 3, p. 393–403, 2007.

MITLAK, B. H.; SCHOENFELD, D.; NEER, R. M. Accuracy, precision, and utility of spine and whole-skeleton mineral measurements by dxa in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 1, p. 119–126, 1994.

NAMKUNG-MATTHAI, H. et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, v. 28, n. 1, p. 80–6, 2001.

OSTERHOFF, G. et al. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. **Injury**, v. 47, n. Suppl 2, p. S11–S20, 2016.

PENG, Z. Q. et al. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. **Bone**, v. 20, n. 3, p. 207–212, 1997.

POPOVIĆ, T. et al. Experimental model of osteoporosis on 14 week old ovariectomised rats: a biochemical, histological and biomechanical study. **Biologica Serbica**, v. 38, n. 1, p. 18–27, 2016.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 455–498, 2006.

RUSSELL, R. G. G. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 6, p. 733–759, 2008.

SAKATA, M. et al. Osteoporotic effect on bone repair in lumbar vertebral body defects in a rat model. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 26, n. 2, p. 1–7, 2018.

SANKAR, P. et al. Ovariectomy in forty rats (*rattus norvegicus*). **Indian Journal of Animal Research**, v. 48, n. 5, p. 516–517, 2014.

SCHLIEFKE, N. et al. Implications of combined Ovariectomy / Multi- Deficiency Diet on rat bone with age-related variation in Bone Parameters and Bone Loss at Multiple Skeletal Sites by DEXA. p. 76–86, 2013.

SHEN, G. Y. et al. Effect of osteoporosis induced by ovariectomy on vertebral bone defect/fracture in rat. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 73559–73567, 2017.

SIMS, N. A. et al. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. **Bone**, v. 19, n. 5 SUPPL., p. 455–461, 1996.

SMITH, B. J. et al. A comparative study of the bone metabolic response to dried plum supplementation and PTH treatment in adult, osteopenic ovariectomized rat. **Bone**, v. 58, p. 151–159, 2014.

SORNAY-RENDU, E. et al. Alterations of cortical and trabecular architecture are associated with fractures in postmenopausal women, partially independent of decreased BMD measured by DXA: The OFELY study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 3, p. 425–433, 2007.

SUGIE-OYA, A. et al. Comparison of treatment effects of teriparatide and the bisphosphonate risedronate in an aged, osteopenic, ovariectomized rat model under various clinical conditions. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 303–314, 2016.

TABATABAEI-MALAZY, O. et al. New horizons in treatment of osteoporosis. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1–16, 2017.

THOMPSON, D. D. et al. FDA GUIDELINES AND ANIMAL MODELS FOR OSTEOPOROSIS Do the Recommended Preclinical Animal Models Address the Efficacy and Safety of Agents for the Treatment and Prevention of Osteoporosis? Are the Preclinical Animal Study Designs and Endpoints Appropriate. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 125–133, 1995.

TIVESTEN, Å. et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 11, p. 1833–1839, 2004.

TURNER, A. S. Animal models of osteoporosis - Necessity and limitations. **European Cells and Materials**, v. 1, p. 66–81, 2001.

UMLAND, E. M.; BOYCE, E. G. Risedronate: A new oral bisphosphonate. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1409–1421, 2001.

VASCONCELLOS, L. DE S.; SABINO, K. R.; PETROIANU, A. Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 3, p. 132–135, 2005.

WALSH, W. et al. Fracture healing in a rat osteopenia model. **Clin Orthop Relat Res**, v. (342), p. 218–27, 1997.

WANG, G. et al. Low-dose risedronate sodium protects bone cells after abrupt oestrogen withdrawal. **Journal of International Medical Research**, v. 40, n. 5, p. 1761–1774, 2012.

WHO. Who Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis At Primary Health. **World Health**, v. May, n. May 2004, p. 1–13, 2007.

WRONSKI, T. J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcified Tissue International**, v. 45, n. 6, p. 360–366, 1989.

YISHAKE, M. et al. Effects of combined teriparatide and zoledronic acid on posterior lumbar vertebral fusion in an aged ovariectomized rat model of osteopenia. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 3, p. 937–944, 2018.

YOUSEFZADEH, N. et al. Review article : OVARIECTOMIZED RAT MODEL OF OSTEOPOROSIS : p. 89–107, 2020.

ZHANG, R. et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. **Bone**, v. 45, n. 3, p. 553–559, 2009.

Brasília, 26 de julho de 2016.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ALTERAÇÕES ÓSSEAS NO TRATAMENTO ORTODÔNTICO ASSOCIADO À ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE BISFOSFONATOS E À ANCORAGEM ESQUELÉTICA", UnBDoC n.º 60906/2016, sob responsabilidade do Professor Paulo Tadeu de Souza Figueiredo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (60). A presente aprovação é válida pelo período de 15/06/2016 a 15/03/2017.

Paula Diniz Galera

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA - UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO