



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Flavia Alfredo Piazza

**Ação do Ácido Zoledrônico e do Raloxifeno no colo
femoral de ratas ovariectomizadas**

Araçatuba – SP

2016

Flavia Alfredo Piazza

**Ação do Ácido Zoledrônico e do Raloxifeno no colo femoral de
ratas ovariectomizadas**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Rita Cássia
Menegati Dornelles

Araçatuba – SP

2016

Aos meus pais, Maria Regina e Mario Roberto, pois sem eles nada disso seria possível. Por acreditarem em mim, me incentivarem e por terem me dado todo o apoio necessário.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ser uma pessoa privilegiada.
- Aos meus pais, Maria Regina e Mario Roberto, por acreditarem em mim e me incentivarem, pelo apoio, pelo amparo nos momentos mais difíceis e pelo amor incondicional.
- Ao meu irmão, Matheus, pela paciência e pelos ensinamentos que foram imprescindíveis para eu chegar até aqui.
- A minha vó, Regina, por ser a pessoa em quem eu me espelho e admiro tanto.
- Ao meu avô, Antenor, meus tios e primos que, de alguma maneira, me ajudaram a chegar até aqui.
- As minhas amigas de longa data, Rhasmye El Rafih, Fernanda Pertinhes e Juliana Souza, por me apoiarem em todos os momentos.
- As minhas amigas de faculdade, Denise Akemi, Caroline Loureiro, Denise Carneiro, Ketheleen Miyaji, Bruna Regina, por terem feito esses anos serem os melhores e por terem caminhado junto comigo nessa conquista.
- A minha professora e orientadora, Prof^a Dra Rita Cássia Menegati Dornelles, pela oportunidade de ter feito essa pesquisa que me trouxe grandes aprendizados, pela paciência que teve em vários momentos, por ser um exemplo de profissional no qual admiro tanto.
- Aos pós graduandos do laboratório de fisiologia, Angela, Ricardo, Luiza, Samuel, Melise, por terem me ajudado de alguma forma.

Em especial:

- A Camila Stringhetti, pessoa na qual devo profunda gratidão. Agradeço por tudo o que me ensinou, pela paciência que teve, por estar sempre disposta a ajudar. Te admiro muito como profissional e, principalmente, como pessoa.
- A Fernanda Fernandes, por sempre estar disposta a me ajudar, pela convivência e pelo apoio dado durante esse trabalho.
- A Camila Branco, pela parceria e pela convivência tão agradável durante todo o trabalho.

“Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz.”

Bill Gates.

Plazza, F. A. **Ação do Ácido Zoledrônico e do Raloxifeno no colo femoral de ratas ovariectomizadas.** 2016. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

Alguns fármacos, como o ácido zoledrônico e o raloxifeno, são utilizados para o tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose. A perda de massa óssea é observada frequentemente em mulheres na pós-menopausa, caracterizada pela diminuição plasmática do hormônio estrógeno. O objetivo deste estudo foi avaliar a atuação do ácido zoledrônico (Zol) e do raloxifeno (Ral) na região do colo femoral de ratas Wistar ovariectomizadas (OVX), bem como a ação da associação desses fármacos. Foram utilizadas 50 ratas de 6 meses, distribuídas em 5 grupos: Controle, OVX/NaCl, OVX/Ral, OVX/Zol e OVX/Ral/Zol. Foram realizadas análises de micro tomografia computadorizada (μ CT), densitometria óssea e ensaio mecânico. Foi realizada também a análise bioquímica para determinação da atividade plasmática da fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Os resultados de μ CT da região cortical do colo femoral não evidenciaram diferenças significantes. Já para o osso trabeculado da região de interesse, os animais do grupo OVX/NaCl apresentaram menor densidade mineral óssea, sendo esse índice restabelecido com os fármacos utilizados no estudo. Os animais OVX que receberam Ral associado ou não ao ZOL apresentaram diminuição na atividade de TRAP. As análises biomecânicas evidenciaram diminuição de força máxima nos animais OVX. Conclui-se com esse estudo que diminuição na concentração plasmática de estrógeno no organismo feminino adulto causa considerável perda da massa óssea, e fármacos como Ral e Zol são eficazes no tratamento, porém quando associados eles não se potencializam.

Palavras-chave: Osteoporose. Ácido zoledrônico. Raloxifeno.

Plazza, F. A. **Action of zoledronic acid and Raloxifene in the femoral neck of ovariectomized rats.** 2016. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Some drugs, such as zoledronic acid and raloxifene are used for the treatment of bone diseases such as osteoporosis. The loss of bone mass is frequently observed in women after menopause due to decreased plasma estrogen hormone. The objectives of this study was to evaluate the performance of zoledronic acid (Zol) and raloxifene (Ral) in the femoral neck region of Wistar ovariectomized (OVX) and the association of action of these drugs. 50 rats of 6 months were used, and were divided into 5 groups: control, OVX/NaCl, OVX/Ral, OVX/Zol and OVX/Ral/Zol. It conducted the analysis of micro computed tomography (μ CT), bone densitometry and mechanical testing. It was also performed the biochemical analysis to determine the plasma alkaline phosphatase activity (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The results of μ CT for cortical showed no significant differences. As for the trabecular, the OVX/NaCl group had lower bone mineral density, and drugs re-established these indices. The result also showed bone densitometry increase in bone mineral density in the groups receiving the treatments, while in OVX/NaCl this group decreased density. There were no significant differences in the analysis of maximum strength and stiffness of the neck. There was a decrease in the concentration of TRAP. However, the biomechanical analysis showed decrease of maximum strength in OVX animals. It concludes with this work that decrease in plasma concentration of estrogen in the body causes considerable loss of bone mass, and drugs like Zol and Ral are effective in the treatment, but when combined they do not potentiate.

Keywords: Osteoporosis. Zoledronic acid. Raloxifene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estágios do ciclo de remodelamento ósseo	13
Figura 2 -	Citocinas mais importantes no microambiente ósseo que regulam a gênese e atividade dos osteoclastos.	15
Figura 3 -	Estrutura de bifosfonato e potência relativa aproximada para inibição de osteoclastos.	16
Figura 4 -	Mecanismo de ação do raloxifeno.	18
Figura 5 -	Esfregaço vaginal coletado a fresco para verificação do ciclo estral das ratas dos grupos experimentais.	20
Figura 6 -	Fases do ciclo estral observadas a fresco em microscópio óptico.	20
Figura 7 -	Cirurgia de ovariectomia das ratas experimentais.	21
Figura 8 –	A: Aparelho Skyscanner 1272. B: região de interesse. C: Região de Interesse manualmente interpolada para osso trabecular e cortical.	25
Figura 9 –	Densitômetro DPX-alpha utilizado para a análise de densitometria óssea areal dos animais experimentais.	25
Figura 10 –	Ensaio mecânico de compressão do colo femoral realizado em máquina EMIC/DL 3000.	26
Figura 11 –	Marcadores sorológicos de remodelação óssea FAL e TRAP.	27
Figura 12 -	Reconstrução em 3D do colo femoral de ratas Wistar adultas (9 meses)	28
Figura 13 –	Análise da microtomografia óssea de ratas Wistar de 9 meses, que receberam por 90 dias NaCl, ácido zoledrônico, raloxifeno ou ácido zoledrônico associado ao raloxifeno. Parâmetros analisados: BV/TV, Tb.Th,	29

Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn. da microtomografia óssea.

- Figura 14 – Análise da microtomografia óssea de ratas Wistar de 9 meses, que receberam por 90 dias NaCl, ácido zoledrônico, raloxifeno ou ácido zoledrônico associado ao raloxifeno. Parâmetros analisados: Ct.Ar e Ct.Th. 30
- Figura 15 - Parâmetros biomecânicos de Densidade Mineral Óssea Areal, força máxima e rigidez da região do colo femoral de ratas Wistar adultas (9 meses). 31

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 - Disposição dos animais e seus respectivos grupos.	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = Análise de Variância
BV.TV = Volume Ósseo/Volume Tecidual
CEUA = comitê de ética para o uso de animais
Cm² = centímetro quadrado
Conn = Conectividade Trabecular
CT. Ar = Área Cortical.
CT.Th = Espessura Cortical.
°C = Celsius
DEXA = Densitometria Óssea
D = dia
DMO = Densidade Mineral Óssea
EPM = Erro Padrão da Média
FAL = Fosfatase Alcalina
h = hora
IL = Interleucina
IP = Intraperitoneal
I.M. = Intramuscular
Kg = Quilograma
M = molar
mm = milímetro
mL = mililitro
mg = miligrama
MgCl₂ = Cloreto de Magnésio
N = Newton
NaCl = Cloreto de Sódio
NaOH = Hidróxido de Sódio
OCN = Osteocalcina
OPG = Osteoprotegerina
OVX = ovariectomizada
pH = Potencial Hidrogeniônico
pHMB = p-hidroxibenzoato
pNP = p-nitrofenolato
pNPP = p-nitrofenilo10Mm
Ral = Raloxifeno
RANK = Receptor do fator ativador nuclear kappa-B
RANKL = Receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante
Rpm = rotações por minuto
RUNX2 = Fator de Transcrição relacionado com o Runt
SERMs = moduladores seletivo do receptor do estrógeno
Tb.Th = espessura trabecular.
Tb.N = número de trabéculas.
Tb.Sp = separação das trabéculas
TNF- α = Fator de Necrose Tumoral α
TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato
 μ CT = Microtomografia Óssea
 μ g = microgramas
 μ L = microlitros
Zol = ácido zoledrônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	HIPÓTESE DO TRABALHO	19
3	OBJETIVOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Animais	19
4.2	Ciclo estral	20
4.3	Ovariectomia	21
4.4	Tratamento	21
4.5	Coleta de Material	22
4.6	Análise Bioquímica	23
4.7	Análise Microtomografia Óssea	24
4.8	Análise Densitometria Óssea	25
4.9	Ensaio Mecânico	25
4.10	Análise estatística	26
5	RESULTADOS	26
5.1	Análise Bioquímica	26
5.2	Análise μ CT	27
	5.21 região trabecular	28
	5.22 região cortical	29
5.3	Análise DEXA e ensaio mecânico	30
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXOS	39

1. INTRODUÇÃO

Os ossos do organismo compõem órgão multifuncional, e dentre suas funções destaca-se homeostase mineral, proteção e locomoção (IWANIEC, 2016). O tecido mais abundante neste órgão é o tecido ósseo, que está sob constante processo de remodelamento, o que permite auto reparação diante de micro danos estruturais e adaptação às forças mecânicas. O ciclo de remodelamento ósseo inicia-se com a atividade de tipo celular responsável pela degradação dos componentes orgânicos e minerais da matriz óssea, os osteoclastos. Estas células são células gigantes, multinucleadas, originadas de células tronco hematopoiéticas e responsáveis pela reabsorção óssea (Figura 1A). Na sequência do ciclo de remodelamento, os macrófagos (Figura 1B) fazem a preparação da superfície óssea e ocorre a atração de células da linhagem de osteoblastos (Figura 1C) que irão finalizar sua diferenciação (Figura 1D) e então iniciar a síntese de matriz óssea que será mineralizada e quiescência do tecido reestabelecida (HILL, 1998).

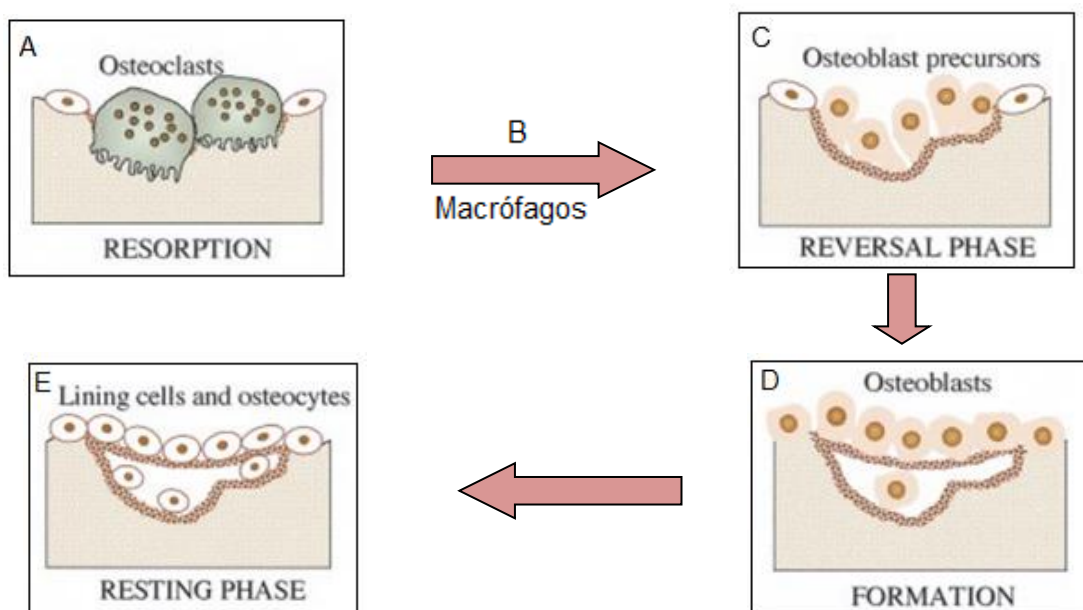


Figura 1: Estágios do ciclo de remodelamento ósseo. A: Fase de Reabsorção - reabsorção óssea por osteoclastos maduros. B: Macrófagos preparam a superfície óssea para a próxima fase. C: Fase de Reversão – precursores de osteoblastos migram até a lacuna de reabsorção, se proliferam e diferenciam em osteoblastos. D: Fase de Formação – Osteoblastos maduros

depositam a nova matriz óssea. E: Fase de Repouso – osteoblastos maduros tornam-se aprisionados na matriz óssea e tornam-se osteócitos ou formam as células de revestimento ósseo sobre o novo osso formado e a quiescência do tecido é reestabelecida. Adaptado de Hill e cols, 1998.

O ciclo de remodelamento ósseo pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles o hipoestrogenismo. O estrógeno é hormônio bastante importante para a saúde óssea, pois é um dos responsáveis por inibir a reabsorção óssea, promovendo a apoptose de osteoclastos (FALONI, 2007). Quando há diminuição da secreção de estrógeno, ocorre desequilíbrio no ciclo de remodelamento ósseo de maneira que a reabsorção excede a formação óssea. O estrógeno atua na via RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa β) /RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β) /OPG (osteoprotegerina), inibindo a formação de osteoclastos, além disso, inibe citocinas essenciais para diferenciação e atividade de osteoclastos, como IL-1 e 6 (interleucina tipo 1 e 6), TNF- α (fator de necrose tumoral α), GM-CSF (Fator estimulante da colônia de granulócitos e macrófagos); além de estimular outras indispensáveis pela regulação negativa da osteoclastogênese, como OPG e TGF- β (RIGGS, 2000). Desta maneira, com a diminuição nas concentrações plasmáticas deste hormônio, provenientes do envelhecimento reprodutivo, ocorre diminuição progressiva e deterioração da massa óssea culminando em osteoporose (SEEMAN, 2003). A figura 2 apresenta esquema dos efeitos positivos e negativos do estrógeno no ciclo de remodelamento ósseo.

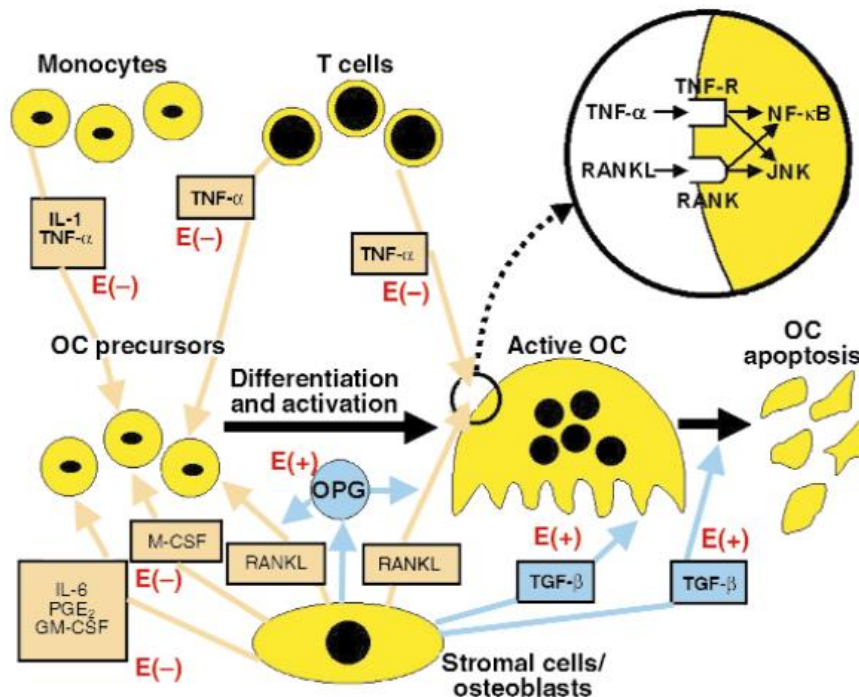


Figura 2: Citocinas mais importantes no microambiente ósseo que regulam a gênese e atividade dos osteoclastos. Efeitos positivos e negativos do estrógeno são demonstrados através de sinais + e -. Adaptado de Riggs, 2000.

A osteoporose é caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, tornando os ossos mais porosos e menos resistentes (AMADEI et al., 2006). Dentre as fraturas osteoporóticas, a fratura de colo femoral é a mais grave, com maior incidência em mulheres e associada a alto índice de hospitalização e morbimortalidade. A cada três segundos, uma pessoa sofre fratura em decorrência da osteoporose no mundo, totalizando aproximadamente 8,9 milhões de fraturas por ano no mundo (Hernlund, 2013.), isso coloca a osteoporose como grande problema de saúde pública e emerge a necessidade de políticas de saúde pública com objetivo de prevenção destas fraturas.

Diversos são os fármacos antirreabsorptivos que atuam na tentativa de diminuir a perda óssea, dentre eles o bifosfonato ácido zoledrônico (Zol) (SCARPA et al., 2010) e o raloxifeno (Ral) (REY et al., 2009). Em odontologia, os bifosfonatos têm importância grande em diversas áreas, como na terapia

periodontal, prevenindo a reabsorção óssea; no tratamento endodôntico, inibindo a reabsorção radicular principalmente em dentes que receberam trauma; durante o tratamento ortodôntico mantém o dente em posição de ancoragem e diminui recidivas após movimentação dentária e óssea (ANBINDER et al., 2007); como coadjuvante no tratamento de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos bucais e maxilofaciais, como distração osteogênica, enxertos ósseos e implantodontia (CARVALHO et al, 2010).

O ácido zoledrônico é bifosfonato de terceira geração que contém nitrogênio em sua composição (Figura 3). Parece ser o bifosfonato mais potente, pois é 10.000 vezes mais potente que o etidronato e 100 vezes mais que opamidronato (GRIZ; COLARES; BANDEIRA, 2006). Após a administração do ácido zoledrônico via intravenosa, devido a sua alta afinidade pela hidroxiapatita do osso, ele é rapidamente retirado da circulação sistêmica e local, aderindo-se a superfície óssea, particularmente nos sítios de atividade osteoclástica (YAMAMOTO, 2010). O Zol bloqueia a via do mevalonato, bloqueando a enzima farnesil difosfato sintetase (FPP), causando uma alteração na membrana celular lipídica do osteoclasto, provocando a apoptose dessas células.

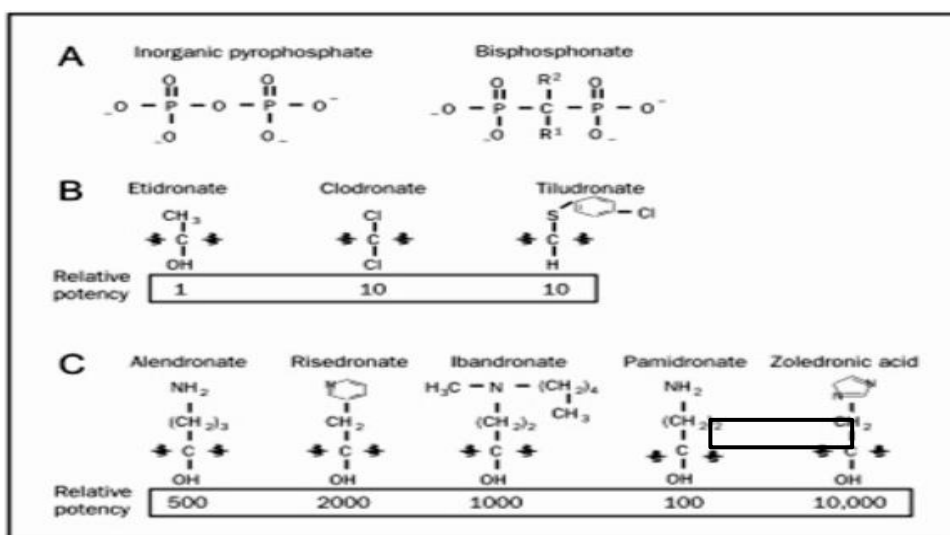


Figura 3: Estrutura de bifosfonato e potência relativa aproximada para inibição de osteoclastos.
Fonte: DRAKE et al., 2008.

O raloxifeno é modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERMs) e constitui classe de moléculas não hormonais com alta afinidade de ligação aos receptores de estrógeno e podem funcionar como agonistas (ossos) ou antagonistas (mama e endométrio) do estrógeno na dependência do tecido-alvo (Figura 4). O Ral apresenta outras ações diretas no tecido ósseo, desencadeando diminuição de IL-6, TNF- α o que causa decréscimo no número e a atividade dos osteoclastos (REY et al., 2009) além de atuar diminuindo a expressão de RNAm para RANKL (SLIWINSKI et al., 2009) e aumento de colágeno tipo I na matriz óssea (VIGUET-CARRIN, GARNERO e DELMAS, 2006).

Dados de nosso laboratório evidenciam que o Ral é capaz de prevenir a osteopenia induzida pelo hipoestrogenismo, através do aumento dos fatores de transcrição RUNX2 (fator de transcrição relacionado com o runt 2) e osterix, assim como das proteínas OCN (osteocalcina) e OPG, além de regular negativamente TRAP e RANKL, favorecendo a osteogênese (STRINGHETTA-GARCIA, 2012).

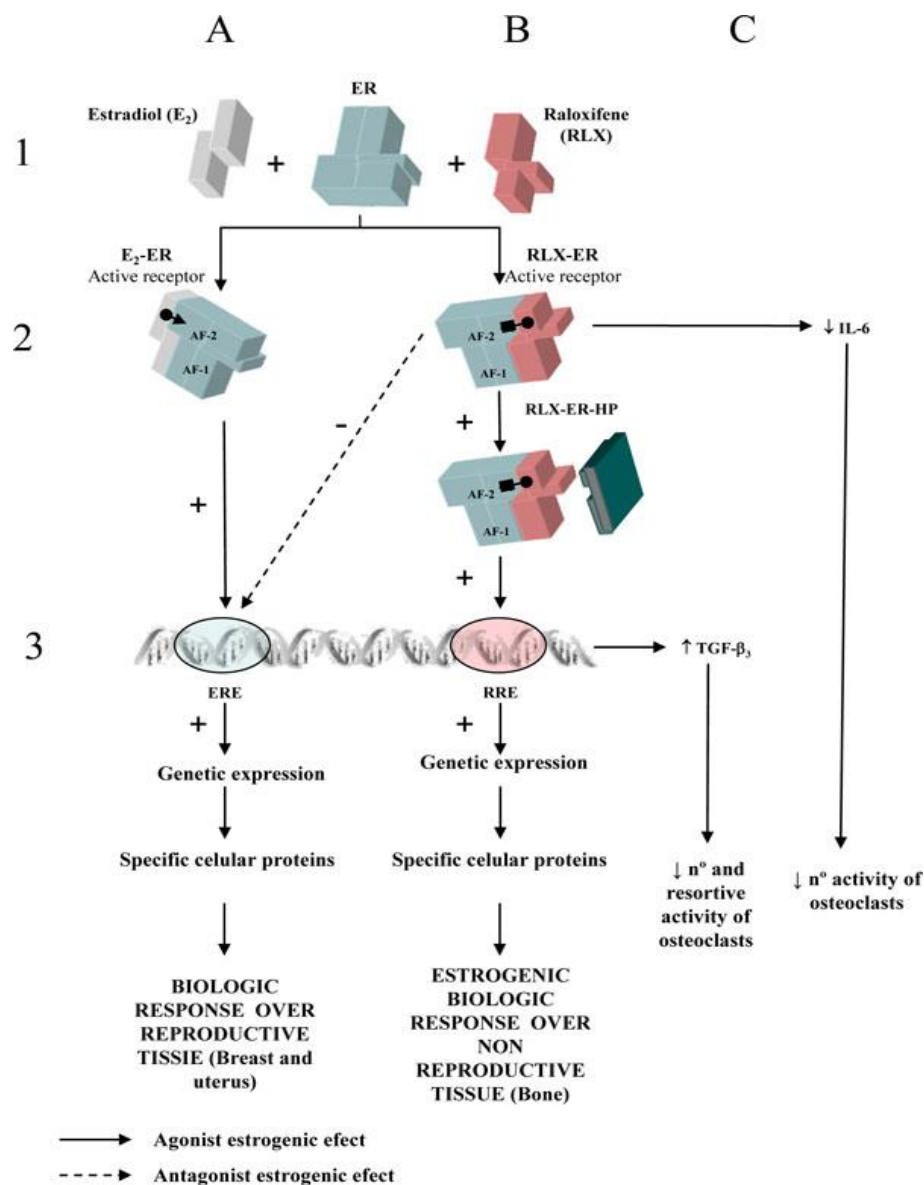


Figura 4: Mecanismo de ação do raloxifeno. Ral se liga no receptor de estrógeno, estimulando RRE, aumentando produção de TGF-β₂ e diminuindo IL-6, provocando diminuição da atividade osteoclástica. Fonte: HATOUM et al., 2011.

Modelos animais com ratas ovariectomizadas, mimetizam as alterações no metabolismo ósseo observadas na osteoporose pós menopausa e têm sido muito utilizados em estudos que investigam a eficácia de potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da osteoporose (LI, 2009), todavia a observação da idade do animal é extremamente importante, visto que é imprescindível que o animal tenha adquirido a máxima massa óssea (LELOVAS, 2008). Desta

forma, no presente estudo investigamos a ação do raloxifeno e ácido zoledrônico, associados ou não, no colo femoral de ratas Wistar adultas.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Considerando que em organismos femininos ovariectomizados a concentração plasmática de estradiol é menor, favorecendo a atividade osteoclástica, hipotetizamos que a terapia não hormonal com Ral e o tratamento com Zol poderiam modular a perda óssea.

3 OBJETIVO

Avaliar a atuação do Ral e Zol na região do colo femoral de ratas Wistar ovariectomizadas (OVX), bem como a ação da associação desses fármacos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais:

Todos os procedimentos utilizados para realização deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista, UNESP, de acordo com o processo 501/2015. Durante a realização deste estudo foram utilizadas 50 ratas da linhagem Wistar (6 meses), mantidas em gaiolas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente com temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de luz controlada (12/12 h), umidade ($55 \pm 10\%$) e acesso livre à água e ração. Dos 50 animais experimentais, aleatoriamente 10 animais do grupo foram mantidos no mesmo período e nas mesmas condições experimentais para obtenção dos valores basais, denominado de grupo controle. Os animais foram distribuídos (10 animais por

grupo experimental) aleatoriamente nos 4 grupos experimentais: controle; OVX/NaCl; OVX/Ral; OVX/Zol e OVX/Ral/Zol.

4.2 Ciclo estral:

O esfregaço vaginal dos animais foi colhido (Figura 5) para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã, segundo a técnica de Long & Evans (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico, durante 15 dias. Foram selecionadas apenas as ratas que estavam em com ciclo estral regular para constituírem os grupos experimentais. A figura 6 identifica as fases do ciclo estral encontradas.



Figura 5: Esfregaço vaginal coletado a fresco para verificação do ciclo estral das ratas dos grupos experimentais. Fonte: laboratório de fisiologia da FOA-UNESP.

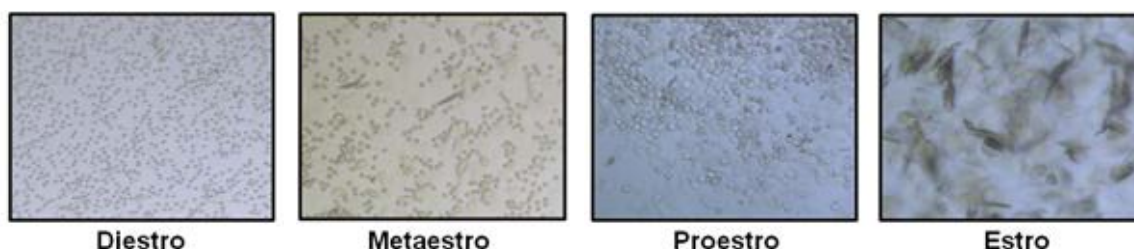


Figura 6: Fases do ciclo estral observadas a fresco em microscópio óptico. Fonte: laboratório de fisiologia da FOA-UNESP.

4.3 Ovariectomia

Após a confirmação da ocorrência do ciclo estral nas ratas, 40 ratas foram ovariectomizadas (OVX), no final do 6º mês. Após anestesia, com cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge/ 50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.), foram realizadas incisões abdominais laterais para exposição das porções distais do útero (Figura 7 A,B). Logo após, foi realizada a remoção dos ovários nos animais (ovariectomia) (Figura 7C). Após a cirurgia, todos os animais experimentais receberam dose profilática de antibiótico (1mL/kg, i.m.; Veterinary Pentabiotic; Fort Dodge Animal Health Ltd). Dez dias após a realização das cirurgias, as ratas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos experimentais (2-OVX/NaCl; 3-OVX/Ral; 4-OVX/Zol; 5-OVX/Ral/Zol), com 10 animais cada.

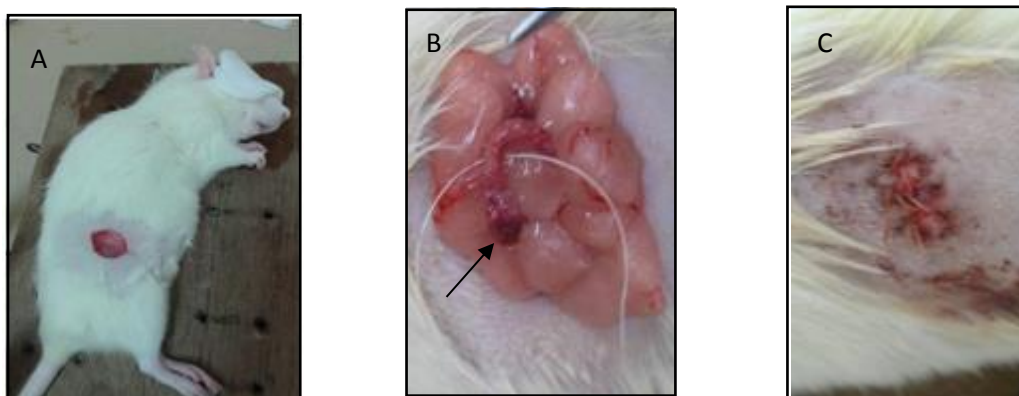


Figura 7: Cirurgia de ovariectomia das ratas experimentais. A: incisão abdominal lateral; B: exposição do ovário para ovariectomia (seta sinalizando o ovário); C: fechamento da incisão na região abdominal. Fonte: laboratório de fisiologia da FOA-UNESP.

4.4 Tratamentos

Durante 90 dias, foi administrado diariamente, via gavagem, 0,3 mL de solução fisiológica (NaCl 0,15M – Grupo 2 e 4) ou Ral (1 mg/Kg/d – Grupos 3 e 5) nos animais experimentais.

O protocolo para determinação da dose do Zol foi elaborado considerando que em humanos, 4 mg de Zol são administrados mensalmente

por infusão intravenosa. Considerando peso humano médio de 60 Kg, a dose de Zol utilizada é de 0,067 mg/Kg, ou seja, 67 µg/kg. Em função do metabolismo do rato ser mais alto (rápido) que o metabolismo humano, administramos 70 µg/kg de Zol três vezes por semana via intraperitoneal (IP) (grupos 3 e 5). Este protocolo para o Zol tem sido utilizado em outros estudos com ratos (ÇANKAYAET al. 2013; BASI et al., 2011; SENEL et al., 2010a; SENEL et al., 2010b). O tratamento com Zol ou NaCl (0,15 M) nos animais, foi iniciado faltando sete semanas para a eutanásia. Os animais foram sacrificados sete semanas após o início do tratamento e no 90º dia, após o início do tratamento com Ral e NaCl.

A tabela 1 apresenta resumo do protocolo experimental utilizado neste estudo.

Tabela 1: disposição dos animais e seus respectivos grupos.

Nº/ Grupos	Grupo Experimental	Idade inicial (meses)	Terapia (Ral ou NaCl) (duração/ dias)	Tratamento (Zol ou NaCl) Início/dia da terapia	Eutanásia Idade (meses)
1	Controle	6	-	-	9
2	OVX/NaCl	6	90	51 ⁰	9
3	OVX/Zol	6	90	51 ⁰	9
4	OVX/Ral	6	90	51 ⁰	9
5	OVX/Zol/Ral	6	90	51 ⁰	9

4.5 Coleta de Material

Após 90 dias de terapia, os animais foram anestesiados (quetamina: Vetaset – Fort Dodge/50 mg/Kg p.c., i.p.; xilazina: Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.) para coleta sanguínea, de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). As amostras de sangue foram colhidas e submetidas à centrifugação a 2500 rpm, por 15 minutos na temperatura de 2°C.

O plasma e o soro foram fracionados em alíquotas e estocado em freezer -20°C e -80°C respectivamente, até o momento das dosagens de Fosfatase Alcalina (FAL) e Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). Em seguida, os animais foram sacrificados por dose excessiva de anestésico e realizada a retirada dos fêmures direito e esquerdo. O fêmur direito foi armazenado em freezer -80°C e o fêmur esquerdo armazenado freezer -20°C.

4.6 Análise Bioquímica

A atividade da TRAP (U/L) no soro foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o protocolo adaptado de GRANJEIRO et al. (1997) e JANCKILA et al. (2006). Resumidamente, alíquota de 25 µL de soro foi submetida ao ensaio em 0,5 mL de mistura reacional que consiste em fosfato de p-nitrofenilo 10mM (pNPP), acetato de sódio 100mM, pH 5,8, tartarato de sódio 50 mM e p-hidroxibenzoato de mercúrio 1 mM (pHMB), este atua por inibição das fosfatases de baixo peso molecular (LAIDLER et al., 1982). A reação foi iniciada por adição do substrato e prosseguiu durante 1h, mantido em banho a 37°C. O ensaio foi terminado por adição de 0,25mL de NaOH 1M, e a absorvância a 405 nm determinada para especificar a quantidade de p-nitrofenolato (pNP) formada durante a reação. Os controles sem enzima foram incluídos em cada ensaio para ajustar a hidrólise não-enzimática de pNPP. Unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 1µmol de pNPP por min a 37°C.

O marcador plasmático de formação óssea, FAL (U/L), foi determinado utilizando ensaio colorimétrico que dosa a formação dependente do tempo de p-nitrofenilo (pNP) a partir de pNPP em conformidade com o protocolo adaptado de CHAVES NETO e colaboradores (2011). O protocolo usado 25µL

de soro num volume total de 0,5 mL contendo 2,5 mM de pNPP, cloreto de magnésio (MgCl_2) 2 mM, tampão glicina 25mM, pH 9,4. A reação foi iniciada por adição do substrato, e procedeu-se durante 30 min, mantido em banho a 37°C. O ensaio foi terminado pela adição de 0,25 mL de solução 1M de hidróxido de sódio (NaOH), e a absorbância a 405 nm determinada para determinar a quantidade de pNP formado durante a reação. Unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima que é necessária para hidrolizar 1 μmol de pNPP por min a 37°C.

4.7 Análise Microtomografia Óssea (μCT)

A microtomografia óssea foi realizada com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea (Figura 8A). A região de interesse de osso cortical e trabecular foi manualmente interpolada; foram realizados 100 slices (fatias) acima da placa de crescimento, com resolução de 6 μm (Figura 8 B,C). O fêmur foi posicionado craniocaudalmente para a análise. Os parâmetros analisados para osso trabecular foram: BV/TV (% - volume ósseo/ tecido ósseo), Tb.Th (mm – espessura trabecular), Tb.N (1/mm – Número de trabéculas), Tb.Sp (mm – Separação trabecular), Conn.Dn (1/ mm^2 – Conectividade). Os parâmetros analisados para osso cortical foram: Ct.Ar (mm^2 – área cortical) e Ct.Th (mm – espessura cortical).

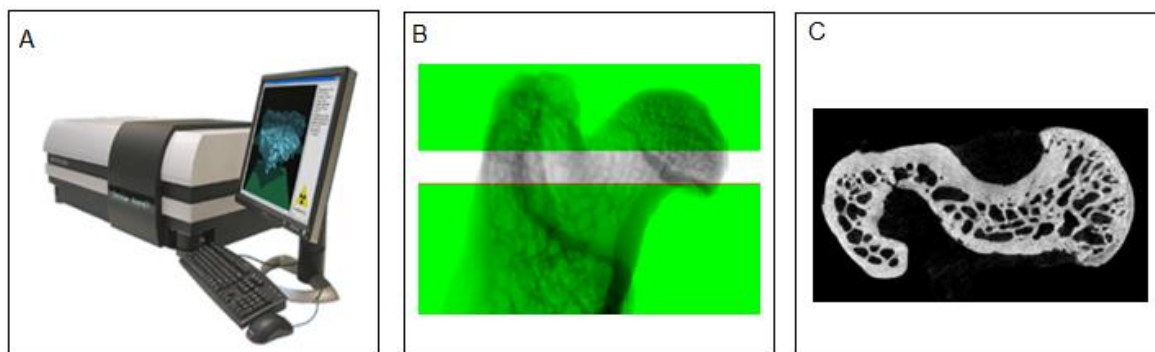


Figura 8: A: Aparelho Skyscanner 1272. B: região de interesse. C: Região de Interesse manualmente interpolada para osso trabecular e cortical.

4.8 Densitometria Óssea Areal (DEXA)

A densidade mineral óssea areal – DMOa - (em g/cm²) foi determinada nos fêmures direitos dos animais, utilizando densitômetro modelo DPX-ALPHA (Figura 9), com software especial para pequenos animais pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FMVA/UNESP.



Figura 9: Densitômetro DPX-alpha utilizado para a análise de densitometria óssea areal dos animais experimentais.

4.9 Ensaio Mecânico

Foi realizado teste compressão nos fêmures direitos dos animais experimentais em máquina Universal Testing Machine EMIC/DL 3000 (Figura

10). Os valores foram registrados em sistemas computacionais do próprio fabricante, que fornece diretamente os valores de força máxima admitidos pelo fêmur. A análise biomecânica será avaliada, por meio da curva de força X deslocamento, a resistência óssea, analisando a força máxima admitida pelo tecido ósseo, força na ruptura e a deflexão na força máxima. A distância do vão de apoio foi de 20 mm, a célula de carga utilizada foi de 2000N.



Figura 10: Ensaio mecânico de compressão do colo femoral realizado em máquina EMIC/DL 3000.

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Foi realizado o teste T entre os grupos Controle e OVX/NaCl. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$ para todas as comparações.

5. RESULTADOS

5.1 Análise bioquímica

As análises das atividades de FAL e TRAP não evidenciaram diferença significativa quando comparado o grupo controle com o grupo de ratas OVX/NaCl. Foi verificado nos animais que receberam a terapia não hormonal

(Ral) e o Zol, atividade enzimática da TRAP menor em relação aos animais OVX/NaCl, OVX/Ral e OVX/Zol (Figura 11). A atividade da TRAP foi menor nos animais dos grupos OVX que receberam a terapia com Ral associada ou não ao Zol quando comparado ao grupo OVX/NaCl. Os resultados obtidos nestas análises estão representados na figura a seguir:

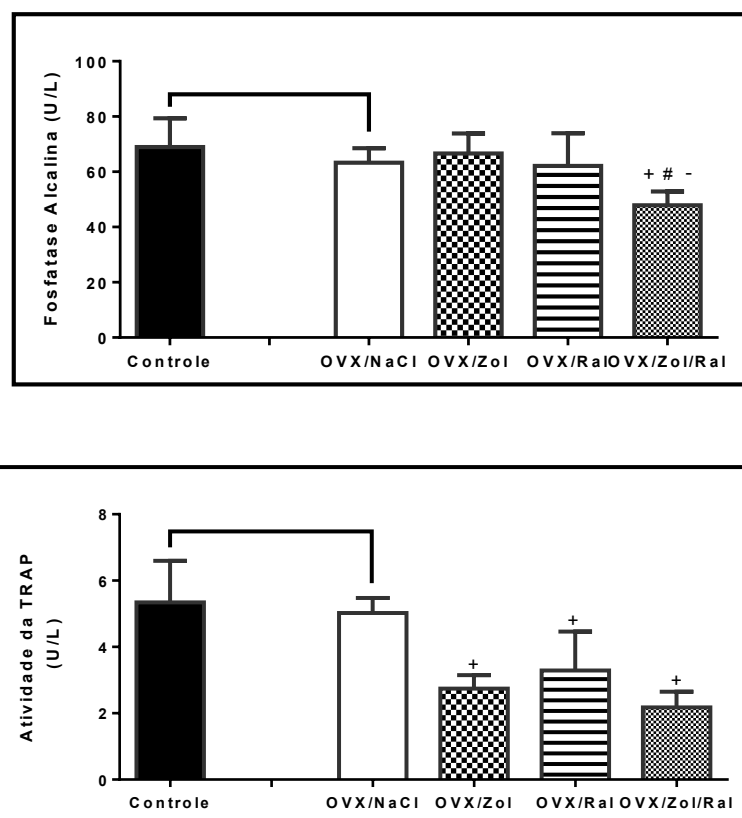


Figura 11: Marcadores sorológicos de remodelação óssea de ratas Wistar adultas (9 meses) controle (C) ou ovariectomizadas (OVX) que receberam por 3 meses a administração de solução fisiológica (NaCl), Raloxifeno (Ral), Ácido Zoledrônico (Zol) ou Ral + Zol. Concentração sorológica de Fosfatase Alcalina (FAL) e Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T (C vs OVX/NaCl) e ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) para analisar o efeito dos tratamentos nas ratas OVX. Símbolos: *vs Controle. +vs OVX/NaCl. #vs OVX/Zol; ~vs OVX/Ral. N= 8-10 animais/grupo.

5.2 Análise Microtomografia Óssea

A reconstrução em 3 dimensões da microarquitetura óssea trabecular e cortical dos animais experimentais estão demonstradas na figura 12.

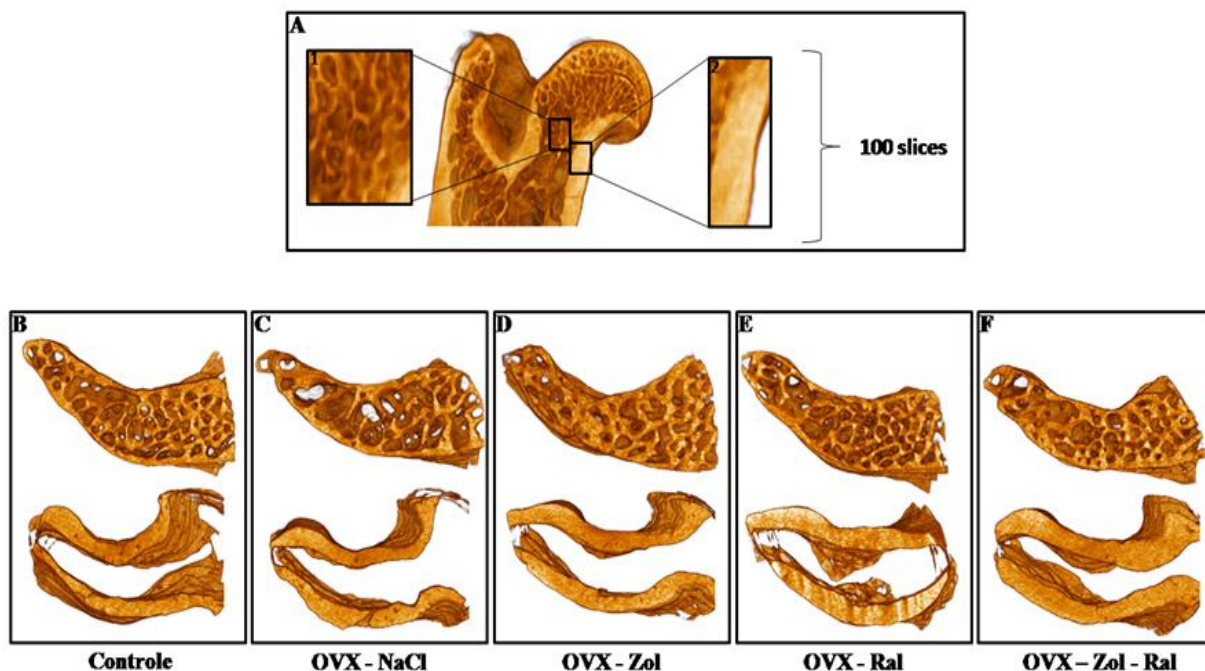


Figura 12: Reconstrução em 3D do colo femoral de ratas Wistar adultas (9 meses) controle (C) ou ovariectomizadas (OVX) que receberam por 3 meses a administração de solução fisiológica (NaCl), Raloxifeno (Ral), Ácido Zoledrônico (Zol) ou Ral + Zol. A: Região de interesse trabecular (1) e cortical (2). As imagens em 3D exemplificam a região trabecular e cortical de animais Controle (B), animais OVX que receberam: NaCl (C), ácido Zol (D), Ral (E) ou associação de Zol e Ral (F).

A análise dos dados obtidos na μ CT nos permite evidenciar:

5.2.1 Região Trabecular

Na região trabecular pode-se observar que houve deterioração da microarquitetura óssea nos animais do grupo OVX/NaCl comparados aos animais do grupo Controle, com diminuição de BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Conn.Dn e aumento de Tb.Sp. Os tratamentos foram eficazes em prevenir a deterioração da microarquitetura óssea trabecular, uma vez que houve aumento de BV/TV e Tb.N nos animais dos grupos OVX/Ral, OVX/Zol e OVX/Ral/Zol quando comparados com os animais do grupo OVX/NaCl. Os animais dos grupos OVX/Ral e OVX/Ral/Zol foram eficazes em aumentar Conn.Dn e os animais do grupo OVX/Zol foi eficaz de diminuir Tb.Sp

comparado com os animais do grupo OVX/NaCl. A figura 13 demonstra os gráficos da região trabecular do colo femoral.

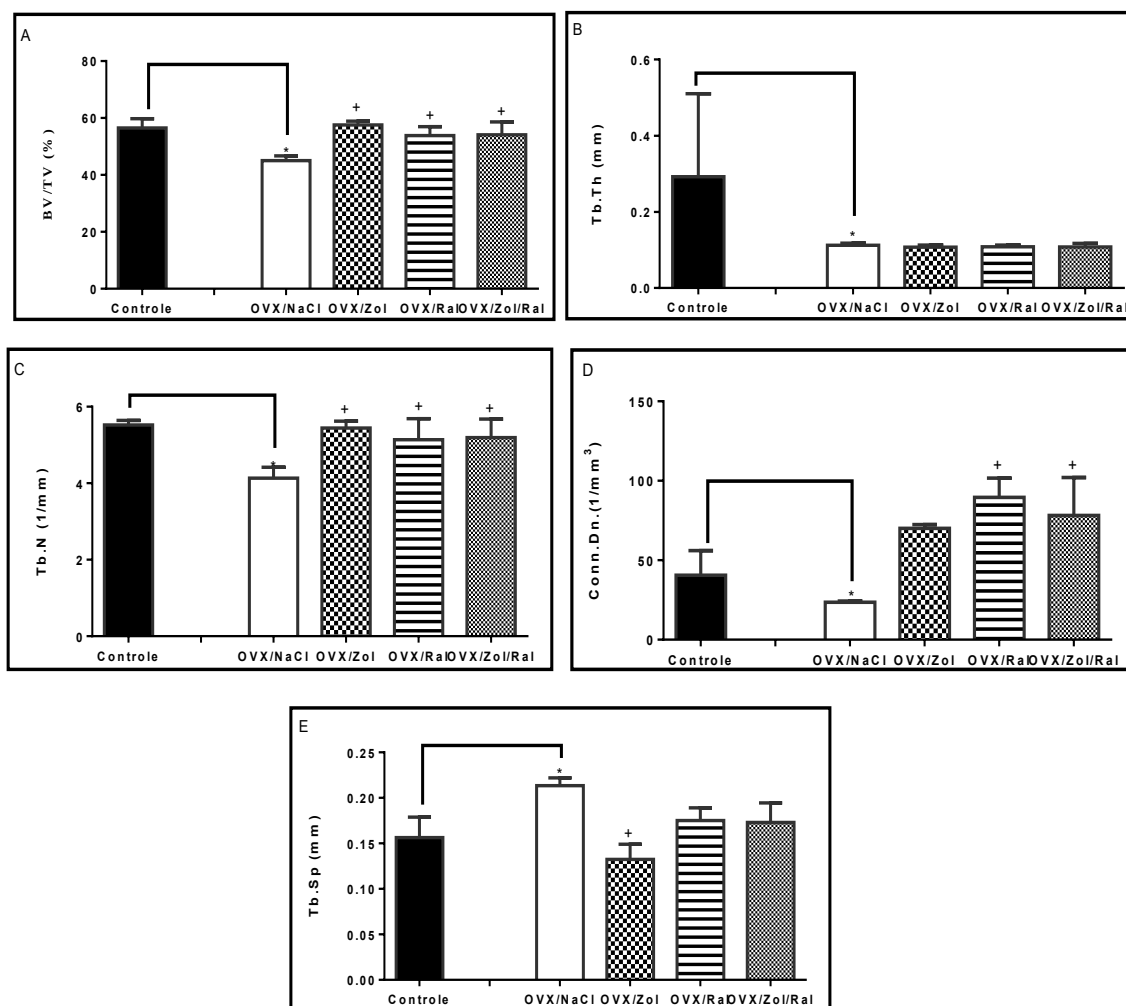


Figura 13 – Parâmetros de microarquitetura óssea trabecular para: A: Razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra (BV/TV), B: Espessura Trabecular (Tb.Th), C: Número de Trabéculas (Tb.N), D: Conectividade entre as trabéculas (Conn.Dn), E: Separação das Trabéculas (Tb.Sp); de ratas Wistar adultas (9 meses) controle (C) ou ovariectomizadas (OVX) que receberam por 3 meses a administração de solução fisiológica (NaCl), Raloxifeno (Ral), Ácido Zoledrônico (Zol) ou Ral + Zol. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T (C vs OVX/NaCl) e ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) para analisar o efeito dos tratamentos nas ratas OVX. Símbolos: *vs Controle. + vs OVX/NaCl. N = 8-10 animais/grupo.

5.2.2 Região Cortical

Na análise da área cortical (CT.Ar) houve aumento significativo do grupo OVX/Ral/Zol em relação ao grupo OVX/Ral. Porém, não houve nenhuma mudança expressiva entre os grupos Controle, OVX/NaCl e os grupos com

tratamento. A análise da espessura cortical (CT.Th), não apresentou diferenças consideráveis em nenhum grupo. A figura 14 demonstra os gráficos da região cortical do colo femoral.

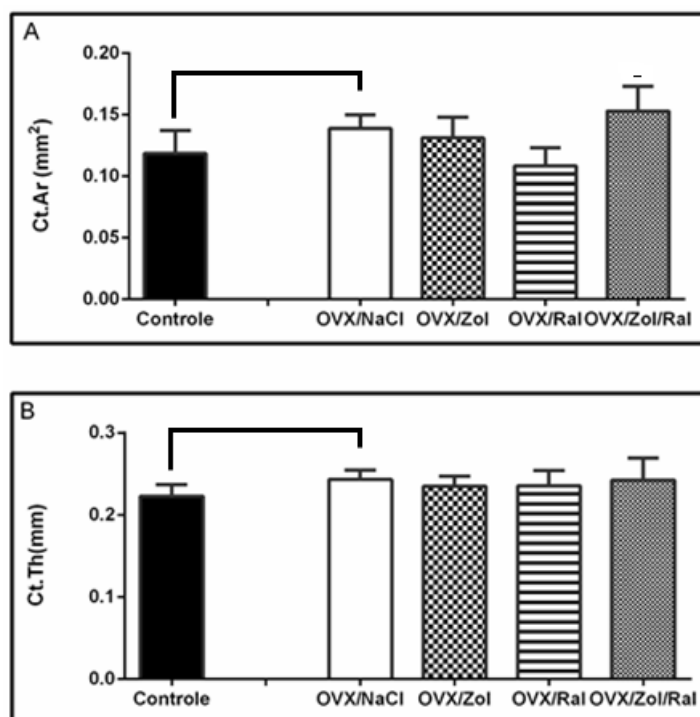


Figura 14: Parâmetros de microarquitetura óssea cortical para: A: área cortical (Ct.Ar) e B: espessura cortical (Ct.Th); de ratas Wistar adultas (9 meses) controle (C) ou ovariectomizadas (OVX) que receberam por 3 meses a administração de solução fisiológica (NaCl), Raloxifeno (Ral), Ácido Zoledrônico (Zol) ou Ral + Zol. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T (C vs OVX/NaCl) e ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) para analisar o efeito dos tratamentos nas ratas OVX. Símbolos: - vs Ral. N= 8-10 animais/grupo.

5.3 Densitometria Óssea e Ensaio Mecânico

Os animais OVX/NaCl apresentaram menor densidade mineral óssea areal (DMOa) quando comparado com o grupo controle. O tratamento com Ral e Ral/Zol aumentaram a DMOa, em relação aos animais do grupo OVX/NaCl e OVX/Zol. Os animais OVX apresentaram menor força máxima na região do colo femoral nos teste mecânicos e as terapias não contribuíram para reverter esse resultado.

Os resultados obtidos no DEXA e ensaio mecânico dos grupos experimentais realizados estão representados graficamente na figura 15.

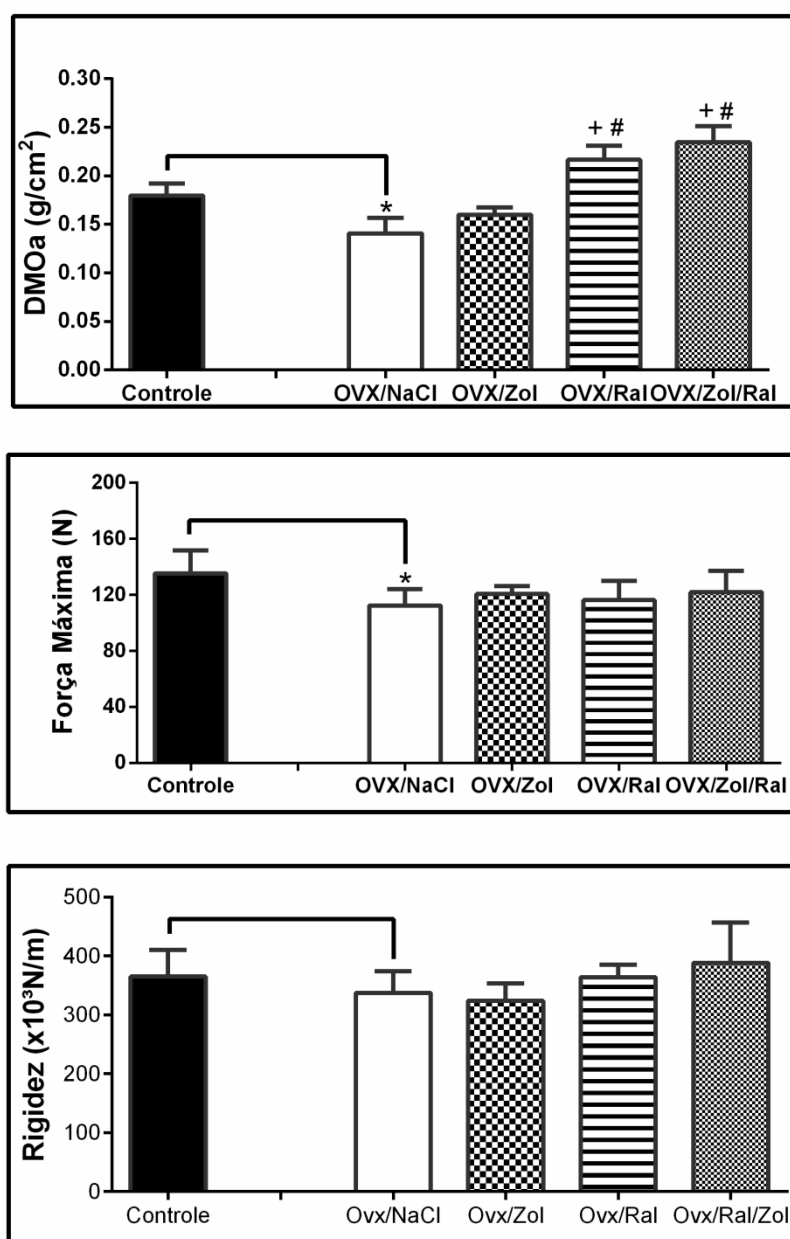


Figura 15 – Parâmetros biomecânicos de Densidade Mineral Óssea Areal (A - DMOa), força máxima (B) e rigidez (C) da região do colo femoral de ratas Wistar adultas (9 meses) controle (C) ou ovariectomizadas (OVX) que receberam por 3 meses a administração de solução fisiológica (NaCl), Raloxifeno (Ral), Ácido Zoledrônico (Zol) ou Ral + Zol. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T (C vs OVX/NaCl) e ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) para analisar o efeito dos tratamentos nas ratas OVX. Símbolos: *vs C; + vs OVX/NaCl; # vs Zol; . N= 8-10 animais/grupo.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram significativa perda óssea na região trabecular do colo femoral de ratas com 9 meses ovariectomizadas, sendo que a terapia com Ral e o tratamento com Zol diminuíram essa perda óssea. Porém, a associação entre esses fármacos não potencializou o efeito, tendo resultado semelhante entre os fármacos utilizados neste estudo.

A literatura demonstra que a ovariectomia em ratas mimetiza os efeitos da diminuição do estrógeno em mulheres pós-menopausa (LI, 2009). A menor concentração plasmática dos hormônios sexuais, induzido pela ovariectomia, estimula a perda acelerada da massa óssea, como a que ocorre em mulheres após a menopausa. Essa osteopenia resulta da adição no aumento da taxa de renovação óssea com reabsorção superior a formação e a maior perda de osso esponjoso com diminuição da reabsorção do cálcio no intestino (KALU, 1991). A diminuição do estrógeno causa aumento na reabsorção óssea, aumentando assim o risco a fraturas (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). Os resultados do grupo OVX/NaCl comprovam que a diminuição desse hormônio está envolvido na perda de massa óssea, bem como diminui o número de trabéculas, a espessura e a conectividade entre elas, além de aumentar a separação trabecular.

Os resultados foram muito mais evidentes da região trabecular do que na região cortical. Não houve diferença significativa na análise da espessura cortical (Ct.Th) e da área cortical (Ct.Ar), com exceção do grupo OVX/Ral/Zol, que conseguiu restabelecer relevante aumento da área cortical. Isso pode ser explicado, pois no tecido trabecular o metabolismo é mais ativo que o tecido cortical (KEAVENY, 2001). Isso pode ser atribuído à ampla área de superfície

trabecular, o que facilita a inibição da remodelação da matriz óssea pelas drogas (SEEMAN, 2013).

A literatura mostra que o Ral, por ser modulador seletivo do receptor de estrógeno, atua na estimulação do Runx2 e osterix, estimulando a diferenciação dos osteoblastos. Porém, como ele atua também diminuindo IL-6, TNF- α e RANKL, inibe a atividade osteoclástica. Isso pode explicar o porquê esse fármaco é eficaz por curto período de tempo. Estudos mostram que o Ral provoca melhora na microarquitetura óssea (TROMP, 2006; BONNET, 2007) com aumento de BV/TV, do número de trabéculas (Tb.N), da espessura trabecular (Tb.Th) e da conectividade (Conn.Dn), além de diminuir a separação trabecular (Tb.Sp). Nesse estudo foram evidentes esses resultados, com exceção da espessura trabecular que não apresentou alteração. O Ral se mostrou eficiente também no aumento da DMOa, no qual se sobressaiu inclusive sobre o Zol.

Assim como o Ral, o Zol apresentou eficiência no controle ósseo trabecular, aumentando o BV/TV, Tb.N e Conn.Dn, e diminuindo Tb.Sp e Tb.Th. Estudos evidenciam a eficácia do Zol em doenças ósseas como osteoporose e doença de paget óssea, sendo o bifosfonato de melhor opção devido a sua maior potência (GRIZ et al., 2006).

A FAL e TRAP são marcadores bioquímicos que mostram também a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, respectivamente. Nesse estudo, observou-se que houve diminuição significativa da TRAP para os grupos com tratamento com Zol, Ral e a associação destes. Isso evidencia a hipótese de que os fármacos têm como ação primária os osteoclastos. Os resultados da fosfatase alcalina não tiveram resultados significantes, com exceção do grupo

OVX/Zol/Ral, o que se pode presumir a hipótese de que a inibição dos osteoclastos impede todo o processo de remodelação óssea.

Estudos apresentados na literatura objetivam demonstrar efeitos aditivos de terapêuticas (MURAI, 2015; LESPESSAILES, 2009), todavia é muito difícil encontrar esta associação de fármacos. No presente estudo, demonstramos significativa diminuição de FAL nos animais do grupo OVX/Ral/Zol, que não foram observados com as terapias individuais, porém não observamos efeitos diferentes com as terapias individuais em microarquitetura trabecular, força máxima e rigidez do osso. Salientamos que para efetivamente investigar a ação da interação de Zol e Ral são necessárias outras análises estatísticas. Aqui observamos apenas as alterações significantes nos aspectos citados em relação aos demais grupos.

O grupo de ratas OVX foi estabelecido como modelo para estudar a osteoporose e pode desempenhar ações importantes na compreensão das ações dos medicamentos bem como no desenvolvimento destes. A diferença significativa entre os modelos animais OVX e não OVX, tal como apresentado neste estudo, reitera a importância da incorporação de doença metabólica nos modelos animais para os estudos prospectivos da osteoporose. Portanto, os resultados apresentados neste estudo favorecem a utilização deste modelo animal e contribui com a proposta para estratégias de tratamento eficazes para osteopenia/osteoporose em organismos com hipoestrogenismo.

7. CONCLUSÃO

Com base nesse estudo, pode-se concluir que a diminuição de estrógeno, em organismo adulto, proporciona significativa perda óssea. Conclui-se também que a terapia com Ral e o tratamento com Zol são eficazes no controle dessa perda óssea, porém, a associação desses fármacos não potencializa seus efeitos.

REFERÊNCIAS

- AMADEI, S. U. et al. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. *J BrasPatolMed Lab.*, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ANBINDER, A. L. et al. The biphosphonates and the Dentistry. *Rev ABO nac.*, v. 14, n. 6, p. 373-379, 2007.
- BONNET N. et al. Combined Effects of Exercise and Propranolol on Bone Tissue in Ovariectomized Rats. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* V. 22, N. 4, 2007.
- CARVALHO, P. S. P. et al. Principais aspectos da cirurgia bucomaxilofacial no paciente sob terapia com bifosfonatos. *RFO UPF*, v. 15, n. 2, p. 183-189, 2010.
- DRAKE, R. M. et al. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. 2008.
- FALONI, A. P. S.; CERRI, P. S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. *Rer.Odontol.UNESP.*, v. 36, n. 2, p. 181-88, 2007.
- GRIZ, L.; COLARES, V.; BANDEIRA, F. Tratamento da doença de paget óssea: importância do ácido zoledrônico. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n. 5, p. 845-851, 2006.
- HARMS E OJEDA. *Biochemical Actions of Hormones*. 1974.
- HATOUM, H. T. et al. Zolendronic acid therapy impacts risks and frequency of skeletal complications and follow-up duration in prostate cancer patients with bone metastasis. *Curr Med. Res. Opin.*, v. 27, n.1, p. 55-62, 2011.
- HERNLUND. E. et al., Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. *Arch Osteoporos* (2013) 8:136.
- HILL. P. A. et. al.; Bone Remodelling. *British Journal of Orthodontics/Vol.* 25/1998/101–107.
- IWANIEC, U. T. et al.; Influence of body weight on bone mass, architecture, and turnover. 2016.
- JANCKILA, A. J., et al. *Osteoporosis Research: Animal Models*. 2006.
- KALU DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss, *Bone Miner.* 15 (1991) 175–191.

KEAVENY. T. M. et. al. Biomechanics of Trabecular Bone. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2001. 3:307–33.

LELOVAS, P. et al.; The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. 2008.

LERNER ,Ulf H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. Journal of Dental Research 85.7 (2006): 584 – 595

LESPESSAILLES. E. et al. Does Exercise Modify the Effects of Zoledronic Acid on Bone Mass, Microarchitecture, Biomechanics, and Turnover in Ovariectomized Rats. Calcif Tissue Int (2009) 85:146–157.

LI. X. et al. Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. Journal of Bone and Mineral Research. V. 24, N. 4, 2009.

MURAI. I. H. et. al.; Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats. Osteoporos Int DOI 10.1007/s00198-014-3017-6. 2015).

REY, J. R. et al. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. Open Orthop J, v. 3, p. 14-21, 2009. ISSN 1874-3250.

RIGGS, B. L., et al.; The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. 2000.

SCARPA, L. C. et al. Osteonecrose nos ossos da maxila e mandíbula associada ao uso do bisfosfonato de sódio. UFES Rev. Odontol., v. 12, n. 1, p. 86-92, 2010.

SEEMAN. E. Age - and Menopause-Related Bone Loss Compromise Cortical and Trabecular Microstructure. Journals of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES Cite journal as: J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2013 October; 68(10):1218–1225.

SEEMAN. E. Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. Physiol 95: 2142–2151, 2003; 10.1152/japplphysiol.00564.2003.

SENEL, F. C. et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. Volume 109, Issue 3, March 2010.

SLIWIŃSKI, L. et al. A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. Acta BiochimPol, v. 56, n. 2, p. 261-70, 2009. ISSN 1734-154X.

STRINGUETTA-GARCIA. C. T. Influência do Treinamento Resistido e do Raloxifeno no Metabolismo Ósseo de Ratas Wistar. 2012

STRINGHETTA-GARCIA. C. T. et al. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. 2016.

TROMP, A. M.; et al. Additional Weight Bearing during Exercise and Estrogen in the Rat: The Effect on Bone Mass, Turnover, and Structure. *Calcif Tissue Int* (2006) 79:404415 DOI: 10.1007/s00223-006-0045-z.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, v. 17, n. 3, p. 319-36, 2006. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341622> >. Stringhetta-Garcia

YAMAMOTO, F. P. Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em ratos tratados com alendronato de sódio. 2010. 105 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ZALULA, F. C.; PEREIRA, M. A. S. Fisiopatologia da osteoporose e o exercício físico como medida preventiva. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar.*, v. 7, n. 3, p. 269-275, 2003.

ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Ação do ácido zoledrônico e do raloxifeno na regeneração óssea alveolar de ratas ovariectomizadas", Processo FOA nº 2015-00501, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Agosto de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Agosto de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Setembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Action of zoledronic acid and raloxifene in alveolar bone regeneration of ovariectomized rats", Protocol FOA nº 2015-00501, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 05, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 01, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 01, 2016.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br