

GISELLE SEGNINI SENRA

**ESTUDO COMPARATIVO DE REPARAÇÃO ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM
RISEDRONATO E *Calcareo fluorica***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

GISELLE SEGNINI SENRA

**ESTUDO COMPARATIVO DE REPARAÇÃO ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM
RISEDRONATO E *Calcareo fluorica***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: **Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**

São José dos Campos
2006

Ao LINCOLN,

*meu marido, presente que Deus me proporcionou.
Homem que me traz equilíbrio, pela sua sabedoria;
segurança, pela sua força e dedicação e que
me envolve com inesgotável fonte de amor.
Te amo!*

*À minha princesa **LÍVIA**,*

*criança cheia de sensibilidade e amor,
amiga que me enche de afagos nas horas difíceis,
companheira em todos os momentos, inclusive os de estudo,
sorriso que traz luz e alegria para a minha vida.
Filha, você é a minha vida!*

*Aos meus pais, **ALDO** e **LENIRA**,*

*pelo amor, apoio e abnegação; por estarem sempre prontos
para virem me socorrer, apesar da distância;
pela confiança que sempre depositaram em mim e
por me alegrarem com esse jeito peculiar que vocês têm
e que eu amo profundamente.*

*Aos meus irmãos, **NADJA**, **DINHO** e **CALI**,*

*que além de irmãos são meus amigos, cada um do seu modo,
e peças importantes na estrutura da minha vida.
Obrigada por nos mantermos tão próximos, apesar da
correria de nossas vidas e da distância que nos separa.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Prof^a. Dr^a. **ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**,
você é uma pessoa de grandeza incomensurável, professora de
conhecimento e capacidade extremos, orientadora de
dedicação e paciência sem fim, amiga presente, exemplo de
sabedoria e equilíbrio. Agradeço à Deus e à você por me
permitirem partilhar dessa convivência com pessoa tão
iluminada, que trouxe ensinamentos de toda natureza para a
minha vida.*

*Prof^a. Adjunta **ROSILENE FERNANDES DA ROCHA**,
pessoa importante da minha jornada profissional,
agradeço pelo acolhimento, pelo carinho e amizade que
sempre me reservou, por todos os ensinamentos recebidos e,
principalmente, pelo exemplo de força e de pessoa valorosa.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. **PAULO VILELA SANTOS JÚNIOR**, por possibilitar a realização desse mestrado.

À **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pelo apoio financeiro.

À Prof. Adjunta **YASMIN RODARTE CARVALHO**, pelas sugestões, auxílios e colaboração durante a realização deste curso.

Ao Prof. Adjunto **LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA**, pelo apoio e sugestões em diversos momentos.

Ao Prof. Titular Dr. **LUIZ CÉSAR DE MORAES** pela disposição e simpatia no auxílio da análise radiográfica.

Ao técnico de laboratório **WALTER CRUZ**, pelo preparo do material histológico, mas principalmente pela paciência e amizade.

A **CAMILO DALELES RENNÓ** pela competência na realização da análise estatística deste estudo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **ROSEMARY DA FÁTIMA SALGADO**, **ERENA MICHIE HASEGAWA** e **MARIA APARECIDA CONSIGLIO DE SOUZA**, pela atenção e disponibilidade.

À secretária **SÍLVIA SCARPEL**, pela ajuda e compreensão em todas as dúvidas, pelos conselhos e orientações profissionais.

À bibliotecária **ÂNGELA DE BRITO BELLINI**, pela disponibilidade e paciência na revisão deste estudo.

Aos funcionários do Biotério, **LOURIVAL JACOB** e **ANTÔNIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELOS** pela colaboração na fase experimental desta pesquisa.

Aos **ANIMAIS EXPERIMENTAIS** cujas vidas foram sacrificadas em benefício do progresso da ciência, a eles o meu profundo respeito.

A todos os **COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** pelo agradável convívio e pela colaboração direta ou indireta na realização deste estudo. Em especial, **PIETRO MAINENTI, FLÁVIA CELINA SGARBI, MÔNICA DAL PIAN NOBRE, RODRIGO DIAS NASCIMENTO, CAROLINA JÚDICA RAMOS, ANDRESA COSTA PEREIRA, SUSANA UNGARO AMADEI, VANESSA ÁVILA SARMENTO SILVEIRA, ANA CRISTINA POSCH, DANIELA MARTINS SOARES e ANGELA BOLANHO.**

À amiga **CRISTINA WERKMAN**, sempre prestativa, pelo tempo dedicado à colaboração em todas as fases da realização deste estudo, tornando-o possível de ser realizado.

Aos amigos **PATRICIA PASQUALI DOTTO** e **GUSTAVO NOGARA DOTTO**, que me incentivaram em todos os momentos, antes e durante a realização deste mestrado, e confiaram na minha capacidade antes mesmo que eu o fizesse.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Remodelação óssea	16
2.2 Osteoporose	28
2.3 Modelos experimentais de osteoporose	38
2.4 Reparação óssea.....	42
2.5 Bifosfonatos	48
2.6 Homeopatia.....	58
3 PROPOSIÇÃO	65
4 MATERIAL E MÉTODO	66
4.1 Animais e grupos experimentais	66
4.2 Método	67
4.2.1 Anestesia	67
4.2.2 Procedimentos cirúrgicos.....	67
4.2.2.1 Ovariectomia e falsa ovariectomia (<i>Sham</i>)	67
4.2.2.2 Execução da lesão óssea	70
4.2.3 Tratamento.....	72
4.2.4 Sacrifício e tempos experimentais	73
4.2.5 Análise do reparo ósseo	73
4.2.5.1 Análise radiográfica	73
4.2.5.2 Análise histológica	75
4.2.5.3. Análise histomorfométrica.....	76
4.2.6 Análise estatística	80
5 RESULTADO	82
5.1 Densidade óptica	82

5.1.1	Análise estatística dos grupos O e S	82
5.1.2	Análise estatística dos grupos R, Cf e O.....	86
5.2	Análise histomorfométrica.....	89
5.2.1	Preenchimento com tecido ósseo nos grupos O e S	89
5.2.2	Preenchimento com tecido ósseo nos grupos R, Cf e O	92
5.2.3	Área de osso trabecular nos grupo O e S.....	95
5.2.4	Área de osso trabecular nos grupos R, Cf e O	99
5.3	Análise histológica descritiva	103
5.3.1	Período de três dias.....	103
5.3.2	Período de seis dias.	104
5.3.3	Período de 12 dias.....	105
5.3.4	Período de 18 dias.....	108
5.3.5	Período de 24 dias.....	111
6	DISCUSSÃO	114
	CONCLUSÃO	130
8	REFERÊNCIAS	131
	ANEXO	148
	<i>ABSTRACT</i>	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	=	Micromolar
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	=	Vitamina D
AP	=	Fosfatase Alcalina
BFs	=	Bifosfonatos
bmp	=	<i>Bitmap</i>
BMP	=	Proteína Óssea Morfogenética
BMU	=	Unidade Multicelular Básica
Ca^{2+}	=	Íons Cálcio
CaF_2	=	Fluoreto de Cálcio
CATK	=	Catepsina K
Cbfa1	=	<i>Core Binding Factor A1</i>
CCD	=	<i>Charged-Coupled Device</i>
Cf	=	Ratas Ovariectomizadas e Tratadas com <i>Calcareia fluorica</i>
CFU-F	=	Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos
CFU-OB	=	Unidades Formadoras de Colônias de Osteoblastos
CH	=	Escala Centesimal Hahnemanniana
cm	=	Centímetros
COBEA	=	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COLIA1	=	Receptor do Colágeno tipo I alpha 1
D	=	Escala Decimal
DEXA	=	Absorciometria Dupla de Emissão de Raios X
DMO	=	Densidade Mineral Óssea
DO	=	Densidade Óptica
EGF	=	Fator de Crescimento Epidérmico
ER	=	Receptor de Estrógeno

FDA = *Food and Drug Administration*
FGF = Fator de Crescimento de Fibroblastos
GH = Hormônio de Crescimento
GM-CSF = Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
H⁺ = Íons de Hidrogênio
H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio
IFN γ = Interferon γ
IGF = Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL = Interleucina
Kg = Quilogramas
LCD = Dieta Pobre em Cálcio
LIF = Fator Inibidor de Leucemia
M-CSF = Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
mg = Miligramas
MgHPO₄ = *Magnesia phosphorica*
mm = Milímetros
MMP = Metaloproteinases
N = Normal
NaCl = Cloreto de Sódio
NaF = Fluoreto de Sódio
NCCAM = *National Center for Complementary and Alternative Medicine*
NOF = *National Osteoporosis Foundation*
O = Ratas Ovariectomizadas e Tratadas com Placebo
ODF = Fator de Diferenciação de Osteoclastos
OMS = Organização Mundial da Saúde
OP = Osteoprotegerina
OPGL = Ligante da Osteoprotegerina
OVX = Ovariectomia ou Ovariectomizado
PDGF = Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE₂ = Prostaglandina E₂
PTH = Paratormônio

PTHR1 = Receptor do PTH Humano
R = Ratas Ovariectomizadas e Tratadas com Risedronato
RANK = *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*
RANK-L = Ligante do RANK
RGD = Seqüência de Aminoácidos Arg-Gly-Asp
RNAm = Ácido Ribonucléico Mensageiro
S = Ratas *Sham* (falso ovariectomizadas) e Tratadas com Placebo
s = Segundos
SHR = *Spontaneously Hipertensive Rats*
SiO₂ = *Silicea*
T4 = Hormônio Tireoideano Tiroxina
TGF- β = Fator de Crescimento Transformante- β
TNF = Fator de Necrose Tumoral
TRAP = Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente
vATPase = ATPase Vacuolar
VDR = Receptor de Vitamina D

SENRA, G.S. **Estudo comparativo de reparação óssea em ratas ovariectomizadas tratadas com risedronato e *Calcarea fluorica***. 2006. 149f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

RESUMO

O aumento da expectativa de vida amplia as possibilidades de doenças degenerativas, como osteopenia e osteoporose, que elevam a ocorrência de fraturas e demandam tratamento prolongado. Os medicamentos usados no tratamento da osteoporose podem interferir no reparo ósseo de fraturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Risedronato (1,5mg/kg/dia) e do medicamento homeopático *Calcarea fluorica* 6CH (3 gotas/dia) no reparo ósseo em ratas com osteopenia induzida. Para isso, 105 ratas foram submetidas à ovariectomia e 35 ratas à cirurgia sham. Após 35 dias, lesões monocorticais de 2,5mm foram realizadas nas tíbias quando, então, iniciou-se a medicação. Os animais ovariectomizados foram divididos em três grupos e um recebeu *Calcarea fluorica* (Cf), outro risedronato (R) e, o terceiro (O), bem como o grupo sham (S), receberam água destilada para efeito placebo. Após três, seis, 12, 18 e 24 dias de tratamento, sete animais de cada grupo foram sacrificados, as tíbias removidas, radiografadas para análise da densidade óptica, descalcificadas e processadas para análise histológica e histomorfométrica. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey (5%). Segundo a análise de densidade óptica (n=7), não houve diferença entre os tratamentos aos três, seis e 12 dias e, aos 18 e 24 dias, o grupo R mostrou os valores mais altos (p<0,05). Através da histomorfometria, foi avaliada a porcentagem de preenchimento com osso neoformado na área total disponível compreendendo o defeito e a cavidade medular e também a porcentagem de osso trabecular dentro da área preenchida pelo calo ósseo aos seis, 12, 18 e 24 dias de tratamento (n=6). Em relação à área de preenchimento total, o grupo R superou os valores dos demais (p<0,05) enquanto que os grupos Cf e O se mostraram com valores iguais em todos os períodos de tempo, diferindo somente aos seis dias, quando o grupo Cf foi superior ao O. A porcentagem de área trabecular dentro da área preenchida pelo calo aos seis, 12 e 18 dias não foi diferente entre os grupos R, Cf e O. Aos 24 dias o grupo O apresentou os maiores valores de área trabecular, sendo diferente do grupo R, com os menores valores, e o grupo Cf mostrou valores intermediários. Concluiu-se que a ovariectomia interferiu de forma prejudicial no reparo e que o medicamento risedronato foi o que estimulou a maior formação óssea e a menor remodelação. A *Calcarea fluorica* 6CH estimulou maior formação óssea nas fases iniciais da reparação quando comparada ao grupo O, mas não interferiu negativamente na remodelação.

PALAVRAS-CHAVE: Alopatis; difosfonatos; homeopatia; *Calcarea fluorica* 6CH; regeneração óssea; osteoporose; ratos; radiografia dentária digital; histomorfometria.

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença metabólica que leva à deterioração da microarquitetura óssea e diminuição da massa óssea. A manifestação clínica mais comum da osteoporose é representada pela ocorrência de fraturas.

A osteoporose é um problema crescente de saúde pública no mundo devido à ocorrência de longevidade aumentada. Também a população brasileira acima dos 65 anos de idade já é a que mais cresce e tende a elevar-se. Alta taxa de mortalidade, morbidade e os custos do tratamento são importantes prejuízos trazidos pelas fraturas osteoporóticas. Assim, a reparação óssea é um dos assuntos de estudo mais urgentes numa sociedade que envelhece porque uma reparação de fratura prejudicada pode aumentar dramaticamente a morbidade de pacientes idosos.

Os aspectos de maior interesse ortopédico são: a fragilidade óssea, a eficácia da fixação de implantes e a consolidação de fraturas. A osteoporose muda o curso da reparação óssea através da diminuição do volume e da velocidade de formação do calo ósseo.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos potenciais dos medicamentos usados para tratar a osteoporose na reparação de fraturas advindas desta doença.

Existe uma variedade de tratamentos disponíveis para o tratamento da osteoporose. Tratamentos anti-reabsortivos que incluem o cálcio, vitamina D, bifosfonatos, calcitonina e a terapia de reposição hormonal têm demonstrado alguma prevenção da perda óssea ou redução de ocorrência de fraturas. Medicamentos anabólicos, que

estimulam a formação óssea como os fluoretos, o paratormônio e análogos também têm sido considerados. Tem-se também testemunhado crescente interesse por tratamentos alternativos como fitoterapia e homeopatia.

Os bifosfonatos constituem um tipo de tratamento muito utilizado para a osteoporose. Entre eles, o risedronato tem se mostrado como medicamento que não só diminui a perda óssea, mas também estimula a formação de novo osso. No entanto, é um tratamento dispendioso e acompanhado de alguns efeitos adversos, principalmente se considerarmos a necessidade do uso prolongado, justificando a pesquisa de novos tipos de tratamento.

A homeopatia curativa oferece uma alternativa interessante aos tratamentos clássicos, uma vez que é de baixo custo e apresenta poucos efeitos adversos, porém, com escassos trabalhos científicos explorando seus efeitos. A *Calcarea fluorica* encontra-se entre os principais medicamentos homeopáticos de tropismo ósseo com possibilidade de atuação positiva no reparo de fraturas ocorridas no decorrer da osteoporose.

Assim, este trabalho se propõe a comparar a ação desse medicamento homeopático ao risedronato, que representa uma das classes de medicamentos alopáticos mais indicadas em casos de osteoporose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Remodelação óssea

O osso é um tecido mineralizado que confere múltiplas funções mecânicas e metabólicas ao esqueleto (DUCY et al.²⁸, 2000), entre elas a manutenção do nível sanguíneo de cálcio, provisão de suporte mecânico para tecidos moles e de alavanca para a ação muscular, abrigando a hematopoiese e dando alojamento e proteção para o cérebro e a medula espinhal (HARADA & RODAN³⁹, 2003).

É um tecido surpreendente, pois, embora sua aparência dê a impressão errônea de inatividade, o osso está em constante atividade, não só no esqueleto imaturo, no qual o crescimento e o desenvolvimento são rapidamente aparentes, mas também no esqueleto maduro, através de constantes e equilibrados processos de formação e reabsorção (RESNICK et al.⁸³, 1995), a remodelação óssea. Na remodelação, que não está relacionada ao crescimento, o processo é muito mais lento (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004; RESNICK et al.⁸³, 1995) e diferentemente da modelação, onde o osso é removido de um local e formado em um local diferente, ocorre neoformação óssea no mesmo local da reabsorção (MANOLAGAS⁶³, 2000).

A atividade metabólica normal do esqueleto adulto, intimamente relacionada à homeostase do cálcio e do fósforo, envolve predominantemente o processo cíclico e contínuo de destruição e renovação ósseas, a remodelação (SZEJNFELD¹⁰², 2000; GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004; RANG et al.⁸²,

2004). A função óssea de promover a homeostase do cálcio se sobrepõe às outras funções do esqueleto. A mobilização de cálcio do osso requer reabsorção óssea e os principais mediadores deste processo são o paratormônio (PTH) e a $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 (HARADA & RODAN³⁹, 2003).

A remodelação é responsável pela completa renovação do esqueleto adulto a cada dez anos (MANOLAGAS⁶³, 2000).

Para Ham³⁸ (1975) a remodelação é necessária porque os sistemas de Havers no osso compacto, ou as trabéculas no osso esponjoso, não duram por toda a vida do adulto. Alguns sistemas, ou parte deles são reabsorvidos, enquanto novos são construídos nos túneis formados pela reabsorção. A formação de novo osso, ou mudança na disposição das trabéculas do osso esponjoso ou mesmo do osso cortical podem melhorar a capacidade da estrutura óssea em suportar peso ou resistir a um novo tipo de força mecânica. Assim, a remodelação também é estimulada pela alteração da função do osso.

O reparo de microfraturas é obtido através da remodelação (RESNICK et al.⁸³, 1995; BANDEIRA et al.⁷, 2000), assim como a preservação da massa óssea e de sua arquitetura (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

A duração da fase reabsortiva da remodelação óssea é estimada em duas a três semanas enquanto que a fase neoformadora dura cerca de três meses. Esses processos ocorrem de maneira conjugada, de forma que a neoformação óssea seja sempre precedida por reabsorção óssea (MUNDY⁶⁶, 1999; SZEJNFELD¹⁰², 2000; HARADA & RODAN³⁹, 2003).

A remodelação acontece em várias áreas microscópicas e focais dispersas pelo esqueleto, ocorrendo de forma cronológica e geograficamente separadas umas das outras (MUNDY⁶⁶, 1999). Em adultos sadios, três a quatro milhões de sítios de remodelação são iniciados por ano e cerca de um milhão estão ativos num dado momento

(MANOLAGAS⁶³, 2000).

A reabsorção óssea é tarefa dos osteoclastos e a formação de novo osso dos osteoblastos. No esqueleto adulto íntegro, todos osteoclastos e osteoblastos pertencem a estruturas temporárias conhecidas como unidade multicelular básica (*basic multicellular unit* - BMU). Uma BMU mede, aproximadamente, 1-2mm de comprimento e 0,2-0,4mm de largura e compreende um grupo de osteoclastos na frente, um outro de osteoblastos na retaguarda, um capilar central, além de suprimento nervoso e tecido conjuntivo associados. A sobrevivência de uma BMU é de seis a nove meses, maior do que a sobrevivência de suas células executoras, sendo necessário suprimento contínuo de novas células (MANOLAGAS⁶³, 2000).

A seqüência de eventos dentro da unidade de remodelação óssea parece ocorrer em quatro fases distintas: ativação, reabsorção, reversão e formação. Durante a fase de ativação, células precursoras presentes na medula óssea, respondendo a sinais físicos e hormonais, concentram-se sobre determinada região da superfície óssea, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados que realizarão a reabsorção (SZEJNFELD¹⁰², 2000).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, que contêm seis a cinquenta ou mais núcleos. Possuem citoplasma granuloso, algumas vezes com vacúolos, fracamente basófilo nos osteoclastos jovens e acidófilo nos maduros com complexo de Golgi, e por vezes, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos. A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares formando pregas. Circundando essa área com prolongamentos, existe uma zona citoplasmática, a zona clara, pobre em organelas, porém contendo muitos filamentos de actina, local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea (HAM³⁸, 1975; JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004).

A proliferação de precursores de osteoclastos é

estimulada fortemente pelo fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), produzido pelos osteoblastos, e mais fracamente pelo fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e pela interleucina-3 (IL-3) (ATHANASOU⁵, 1996).

Athanasou⁵ (1996) afirma que os osteoclastos são membros do sistema fagocítico-mononuclear; derivados de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, seguem a linhagem hematopoiética de monócitos-macrófagos e têm também precursores circulantes, os monócitos e macrófagos. No microambiente celular e hormonal do osso, monócitos, macrófagos e seus precursores hematopoiéticos são todos capazes de se diferenciar em osteoclastos que irão formar lacunas de reabsorção e expressar receptores para calcitonina, ambas características exclusivas destas células, além de expressar a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), todas características que não estão presentes em seus precursores. A diferenciação osteoclástica requer a presença de células do estroma da medula óssea e osteoblastos, células que têm papel central na ativação e controle hormonal da ação osteoclástica.

Quando são feitas coculturas de precursores de osteoclastos e células osteoblásticas separadas por membrana, osteoclastos não se diferenciam, mesmo na presença de agentes reabsortivos. Células osteoblásticas modulam o desenvolvimento de osteoclastos por mecanismos que requerem interação célula/célula (UDAGAWA et al.¹¹¹, 1995). Outros autores afirmam que em adição aos sinais autócrinos, parácrinos e endócrinos, as interações célula/célula e célula/matriz são necessárias para o desenvolvimento de osteoclastos e osteoblastos. Estas interações são mediadas por proteínas expressas na superfície dessas células e seriam responsáveis pelo contato entre o precursor do osteoclasto e células do estroma ou osteoblastos. Moléculas de adesão estariam envolvidas na migração destas células ao local de reabsorção e na polarização, ativação e apoptose de osteoclastos (ATHANASOU⁵, 1996; MANOLAGAS⁶³, 2000).

Fato importante na compreensão da biologia do osteoclasto foi a descoberta da RANK-L (RANK *ligand*) e da osteoprotegerina (OPG). A RANK-L é uma molécula sinalizadora da família do fator de necrose tumoral (TNF), secretada por osteoblastos. Sua presença é necessária e suficiente para a diferenciação de osteoclastos a partir de seus precursores que apresentam o receptor RANK (*receptor activator for nuclear factor κ B*) (ZAIDI et al.¹²⁰, 2003), um receptor de diferenciação e ativação de osteoclasto. Boyle et al.¹⁵ (2003) também citam o M-CSF como imprescindível na osteoclastogênese e outros autores (KONG & PENNINGER⁵¹, 2000) afirmam que nem o RANK-L nem o M-CSF são capazes de induzir osteoclastos sozinhos, somente atuando em sinergismo.

Fatores que estimulam o desenvolvimento de osteoclastos incluem a prostaglandina E₂ (PGE₂) (BANDEIRA et al.⁷, 2000; BOYLE et al.¹⁵, 2003) interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, fator inibidor de leucemia (LIF), oncostatina M, fator neurotrópico ciliar, TNF, GM-CSF, M-CSF, ligante c-kit, fator de crescimento transformante- β (TGF- β), PTH e 1,25(OH)₂ vitamina D₃. Atuando em oposição estão a IL-4, IL-10, IL-18, interferon γ (IFN γ) e a calcitonina (MANOLAGAS⁶³, 2000).

Osteoblastos são as células-alvo para a ação dos fatores locais e dos hormônios sistêmicos que estimulam ação osteoclástica, liberando um fator solúvel ou um segundo mensageiro que estimula diretamente a reabsorção óssea. Alternativamente osteoblastos elaboram um fator para a matriz ou fator de membrana que estimula atividade reabsortiva após contato com osteoclastos maduros. Em contraste, os maiores inibidores da ação osteoclástica atuam diretamente nos osteoclastos (ATHANASOU⁵, 1996).

O osteoblasto é estimulado pelo calcitriol, PTH e pela IL-6 a expressar o RANK-L (ou OPGL - ligante da osteoprotegerina, ou ODF - fator de diferenciação de osteoclastos). O osteoblasto também sintetiza e libera a OPG, idêntica ao RANK, que atua como receptor de atração e

que pode ligar-se ao RANK-L e inibir a ligação deste ao RANK (MARIE⁶⁴, 2001; RANG et al.⁸², 2004), bloqueando a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (BOYLE et al.¹⁵, 2003). A expressão de OPG é diminuída pela PGE₂ e aumentada pela 1,25(OH)₂vitamina D₃, íons Ca²⁺ e TGF-β (KONG & PENNINGER⁵¹, 2000).

Osteoclastos maduros, apresentando TRAP, catepsina K (CATK), receptor para calcitonina e integrina β₃ são ativados levando ao início da reabsorção óssea. Em resposta à ativação do RANK pelo seu ligante, o osteoclasto se torna polarizado e inicia mudanças estruturais internas, como reorganização do citoesqueleto, (BOYLE et al.¹⁵, 2003) formação de anéis de actina (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997) e de áreas de junção entre a superfície óssea e a membrana basal formando um compartimento selado.

A ligação à matriz óssea envolve a seqüência específica de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) presente na matriz óssea e no colágeno, fibronectina, osteopontina, trombospondina, sialoproteína óssea e vitronectina (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997) com integrina β₃ (ou receptor vitronectina integrina v-3) (MUNDY⁶⁶, 1999). Essa ligação é essencial para a polarização do osteoclasto, mas parece ser dependente da presença de propriedades físicas da matriz como dureza, rigidez e aspereza, não ocorrendo em superfície desmineralizada ou osteóide (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997).

Este compartimento externo entre o osteoclasto e o osso é acidificado através da exportação de íons de hidrogênio (H⁺), ação que envolve a expressão de ATPase vacuolar (vATPase) (GEORGE et al.³⁴, 2004) existente na borda vilosa do osteoclasto (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997). Há também a secreção de enzimas líticas, como a TRAP e pro-CATK, para esse compartimento (BOYLE et al.¹⁵, 2003).

Uma vez estimulado, o osteoclasto produz quantidades substanciais de ácido lático e hialurônico, o que resulta em redução do pH local e maior poder de dissolução das fibras colágenas. A ação em

conjunto de collagenases e do baixo pH no compartimento de reabsorção leva à digestão extracelular das fases orgânica e mineral da matriz óssea (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

Através deste processo o osteoclasto destrói o osso e os produtos dessa degradação são processados e liberados na circulação (BOYLE et al.¹⁵, 2003).

Alguns trabalhos têm sugerido que a superfície óssea é preparada para a reabsorção pela ação de collagenases liberadas por osteoblastos que revestem a superfície óssea uma vez que estes podem produzir enzimas capazes de ativar collagenases latentes, como o ativador de plasminogênio (MUNDY⁶⁶, 1999) e a cascata da plasmina proteolítica. O PTH e outros agentes reabsortivos teriam capacidade de estimular o aumento da produção dessas proteases pelos osteoblastos, levando à digestão da matriz orgânica desmineralizada (osteóide) que cobre toda superfície óssea e expondo a matriz mineralizada, o que serviria de estímulo para ativação de osteoclastos (ATHANASOU⁵, 1996). Além da ação das proteases, os osteoblastos também seriam uma segunda fonte de prótons contribuindo para a acidificação pericelular, que tem importante papel na degradação de áreas ósseas desmineralizadas. A estimulação dos osteoblastos por TNF induz acidificação 20% acima do nível de equilíbrio, além de aumentar a expressão das metaloproteinases MMP-1 e MMP-3 (GEORGE et al.³⁴, 2004).

Osteoclastos são células terminalmente diferenciadas com limitada sobrevida (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997), sendo que a sobrevivência e participação em sucessivos ciclos de reabsorção são reguladas por hormônios e citocinas. RANK-L e IL-1 aumentam a sobrevida de osteoclastos maduros (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997; BOYLE et al.¹⁵, 2003). A apoptose dos osteoclastos parece envolver o TGF liberado através da reabsorção óssea (MUNDY⁶⁶, 1999) ou mediado através do estrógeno (SUDA et al.¹⁰⁰, 1997).

Ainda não está claro o que encerra a fase reabsortiva,

mas um elevado nível de cálcio local ou substâncias liberadas pela matriz parecem estar envolvidos (BANDEIRA et al.⁷, 2000), servindo como agentes da conjugação entre a reabsorção e a formação óssea (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

Na fase de reversão, células mononucleares da linhagem de monócitos e macrófagos preparam a superfície para os osteoblastos iniciarem a formação produzindo uma glicoproteína à qual os osteoblastos podem se aderir (BANDEIRA et al.⁷, 2000). Szejnfeld¹⁰² (2000) relata que, durante 7 a 14 dias, uma espessa linha de “cimento” é depositada. Essa região consiste de fibras colágenas organizadas ao acaso demarcando o limite da lacuna de reabsorção e ligando o osso neoformado ao osso velho.

A fase da formação óssea, intimamente ligada à reabsorção, começa quando os pré-osteoblastos são atraídos para a cavidade de reabsorção criada pelos osteoclastos (SZEJNFELD¹⁰², 2000).

Como os osteoclastos, também os osteoblastos são derivados de precursores originados na medula óssea. Os precursores dos osteoblastos são células-tronco mesenquimais pluripotentes, que também dão origem às células estromais da medula óssea, condrócitos, células musculares e adipócitos. Esses precursores eram chamados de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F) e atualmente são chamados de CFU-osteoblastos (CFU-OB). Osteoblastos também podem se originar de pericitos, células mesenquimais aderentes ao endotélio vascular (MANOLAGAS⁶³, 2000).

Os osteoblastos são células grandes, arredondadas ou poligonais, com núcleo excêntrico e citoplasma amplo, mostrando características ultra-estruturais de células produtoras de proteínas, como grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi (HAM³⁸, 1975). Apresentam intensa basofilia, principalmente quando em intensa atividade sintética, porém, quando em estado pouco ativo tornam-se menores e a basofilia diminui (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004).

Estas células mostram-se achatadas e alongadas possuem poucas organelas e recobrem a maior parte da superfície óssea no esqueleto adulto. Parecem estar em estado de repouso ou relativamente inativas, e são células com capacidade de transformação em osteoblastos ativos (ATHANASOU⁵, 1996).

O mecanismo da conjugação formativo-reabsortiva parece envolver substâncias produzidas localmente (KRANE & NEER⁵⁴, 1990) e a ocorrência da remodelação óssea simultaneamente em múltiplos locais é vista como uma evidência de controle local, de forma autócrina e/ou parácrina, mas também de mecanismos sistêmicos (MUNDY⁶⁶, 1999; BANDEIRA et al.⁷, 2000; DUCY et al.²⁸, 2000).

Uma das teorias é que fatores estimuladores de osteoblastos como fator de crescimento semelhante à insulina IGF-I, IGF-II e TGF- β , que estavam mergulhados na matriz óssea (RANG et al.⁸², 2004), além de proteínas estruturais como o colágeno tipo 1 e a proteína gla-óssea, são liberados da matriz óssea durante a reabsorção osteoclástica levando à quimiotaxia de osteoblastos ou seus precursores para os locais de reabsorção. A proliferação e diferenciação dos precursores de osteoblastos também são mediadas por fatores locais liberados durante a reabsorção como IGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (MUNDY⁶⁶, 1999; MANOLAGAS⁶³, 2000; GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

No próximo evento seqüencial durante a fase de formação ocorre a diferenciação do precursor de osteoblasto em célula madura (MUNDY⁶⁶, 1999).

Os fatores que promovem a osteoblastogênese, com exceção das proteínas ósseas morfogenéticas (*bone morphogenetic proteins* - BMPs), e em particular, a BMP-2 e -4 que são expressas na vida pós-natal e servem para manter o contínuo suprimento de osteoblastos, não podem induzir diferenciação de células mesenquimais

precursoras da medula óssea do adulto não comprometidas em osteoblastos (MANOLAGAS⁶³, 2000). O comprometimento precoce dos precursores requer a expressão do fator de transcrição Cbfa1 (*core binding factor A1*), que regula a transcrição de vários genes responsáveis pelo fenótipo osteoblástico adulto produtor de colágeno tipo I, sialoproteína óssea, osteopontina, TGF- β e osteocalcina. Outras famílias de fatores de transcrição também são importantes, entre eles o Dlx5 (MARIE⁶⁴, 2001), que também regula a osteocalcina, a fosfatase alcalina, assim como a mineralização (MANOLAGAS⁶³, 2000). BMP_S podem induzir a expressão de Cbfa1 (DUCY et al.²⁸, 2000).

O TGF- β pode controlar o estado de repouso da diferenciação osteoblástica *in vivo* e inibir a expressão de Cbfa1 em culturas de osteoblastos (DUCY et al.²⁸, 2000). Osteoblastos secretam e depositam TGF- β na matriz óssea e podem responder a ele num modelo autócrino de ação, sendo que esta ação depende do estágio de diferenciação da célula. TGF- β estimularia proliferação e diferenciação precoce de osteoblastos enquanto inibiria diferenciação terminal reprimindo a transcrição de Cbfa1, que também está implicado na regulação da deposição de matriz óssea por osteoblastos diferenciados (ALLISTON et al.², 2001), sendo a expressão em grande quantidade de TGF- β_2 em camundongos transgênicos responsável pela mineralização defeituosa, mesmo com o número grande de osteócitos (MAEDA et al.⁶¹, 2004).

Para Maeda et al.⁶¹ (2004), o papel endógeno do TGF- β na formação óssea ainda não foi totalmente elucidado, tendo sido relatados efeitos positivos e negativos no osso. A inibição do TGF- β não afetaria dramaticamente a diferenciação osteoblástica na fase precoce de comprometimento, pois levaria a um aumento da expressão de BMPs. Na fase de maturação, a expressão de TGF- β e de seus receptores é induzida, sugerindo sua ativação durante este período.

Tem sido sugerida uma regulação neuroendócrina para osteoblastos através da leptina, sintetizada nos adipócitos e com receptor no hipotálamo. A leptina atua na regulação da massa óssea, obesidade e reprodução. Não afeta a diferenciação osteoblastos, nem age diretamente nos mesmos afetando sua função, sua ação é centralmente controlada no hipotálamo, tendo um efeito inibitório na formação óssea (DUCY et al.²⁸, 2000; HARADA & RODAN³⁹, 2003).

Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) e também são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004), que ocorre durante em média 15 dias após a deposição da matriz (KIMBLE⁴⁹, 1997).

Durante o processo de mineralização, os osteoblastos estabelecem um microambiente livre de inibidores de cristalização, tais como proteínas séricas ligadoras de Ca^{2+} e pirofosfatos. Subseqüentemente, ocorre a precipitação dos cristais de hidroxiapatita em associação com as fibras de colágeno. Admite-se que a enzima fosfatase alcalina desempenhe um papel importante na mineralização. Os osteoblastos contêm grandes quantidades de fosfatase alcalina cuja atividade encontra-se aumentada durante esta fase e que atua na clivagem dos grupamentos fosfato, levando tanto à diminuição da efetividade dos inibidores locais de calcificação quanto no aumento da concentração de fosfato nos locais de mineralização (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003). A precipitação da porção mineral pode ocorrer apenas na presença de concentrações ótimas de íons cálcio e fosfato, podendo ser regulada pelos osteoblastos (KRANE & NEER⁵⁴, 1990).

Na fase final do processo de formação cessa a atividade osteoblástica. A lacuna de reabsorção é reparada completamente ou quase que completamente (MUNDY⁶⁶, 1999). A maioria dos osteoblastos se torna células achatadas de revestimento ósseo, algumas osteócitos e outras sofrem apoptose (MARIE⁶⁴, 2001). As células de revestimento se

tornam menos ativas talvez pela ação do TGF (MUNDY⁶⁶, 1999). Em adição ao RANK-L, o TNF- α age em sinergismo como um sinal para a apoptose de osteoblastos (ZAIDI et al.¹²⁰, 2003).

Uma vez completada a formação óssea, há um prolongado período de repouso com pouca atividade celular naquela unidade óssea, até que um novo ciclo de remodelação se inicie (BANDEIRA et al.⁷, 2000). Durante a secreção da matriz óssea alguns osteoblastos ficam retidos no osteóide, formando os osteócitos terminais e os outros que ficaram revestindo interagem com precursores de osteoclastos e os ativam, reiniciando assim o ciclo (RANG et al.⁸², 2004).

Muitos outros hormônios e fatores de crescimento sistêmicos podem acelerar o ciclo de remodelação, na modulação da formação da matriz óssea: PTH, 1,25(OH)₂D₃, insulina, hormônio de crescimento, esteróides sexuais, calcitonina, hormônios tireoideanos e glicocorticóides (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

Todos os processos fisiológicos, patológicos e terapêuticos exercem influência no esqueleto por meio de sua ação sobre o ciclo de remodelação. Sob certas circunstâncias, cada ciclo de remodelação pode resultar em pequena deficiência óssea que, acumuladas acarretarão incremento da taxa de perda óssea (SZEJNFELD¹⁰², 2000). As condições que levam à perda de massa óssea não acontecem por processos completamente diferentes e sim através do desarranjo do processo normal de remodelação óssea. Daí a importância de conhecimento dos princípios dessa remodelação para poder entender a patogênese da osteoporose (MANOLAGAS⁶³, 2000).

2.2 Osteoporose

Uma definição internacionalmente aceita descreve a osteoporose como uma doença sistêmica e progressiva caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade e suscetibilidade à fraturas (GENANT et al.³³, 1999).

Atualmente, a densitometria óssea por DEXA (absorciometria dupla de emissão de raios X) da coluna lombar e dos fêmures proximais é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da osteoporose, para avaliação do risco de fraturas, para o acompanhamento da evolução da doença e para monitorar o tratamento (GENANT et al.³³, 1999; BRANDÃO & HAUACHE¹⁶, 2005). Esse sistema é calibrado para expressar os resultados em gramas por centímetros quadrados (g/cm^2 ; gramas de mineral ósseo/ cm^2 de área analisada) gerando o valor de densidade mineral óssea (DMO).

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), utiliza-se o T score (a média de DMO de adultos jovens normais menos a DMO do paciente, dividido pelo desvio-padrão da média de adultos jovens normais) para o diagnóstico da osteoporose: valores até -1,0 desvio-padrão da média são considerados normais, valores entre -1,0 e -2,4 revelam osteopenia, enquanto que valores maiores ou iguais a -2,5 diagnosticam osteoporose. Cada desvio-padrão abaixo da média aumenta de 1,5 a 3,0 vezes o risco de fratura, dependendo do sítio ósseo analisado (LEDFOORD et al.⁵⁷, 1998; BRANDÃO & HAUACHE¹⁶, 2005). A diminuição da densidade maior que 1 desvio-padrão significa 10 a 12 % de perda de massa óssea (LANGER⁵⁶, 2004). Pode-se ainda classificar a osteoporose como grave ou estabelecida quando a DMO for maior que 2,5 desvios-padrão abaixo da média, na presença de uma ou mais fraturas (SZEJNFELD¹⁰², 2000; GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

A radiografia simples apresenta pouca sensibilidade para o diagnóstico de osteoporose, revelando a perda óssea quando esta já é maior do que 30-50%. No entanto, é o método de escolha para a verificação de fraturas (RADOMINSKI et al.⁸¹, 2002; GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003; LANGER⁵⁶, 2004; BRANDÃO & HAUACHE¹⁶, 2005).

Outras técnicas também podem ser usadas para acessar o *status* esquelético e ajudar no monitoramento do risco de fraturas, como o ultra-som quantitativo e a tomografia computadorizada (GENANT et al.³³, 1999).

A resistência óssea tem dois componentes: a densidade óssea (mensurada em gramas por unidade de área ou volume) e a qualidade óssea. A densidade óssea na osteoporose é determinada pela quantidade de perda óssea ocorrida em relação ao maior valor de massa óssea de um dado paciente, enquanto que para a qualidade óssea se consideram conceitos de arquitetura, mineralização, lesões ocorridas (como as microfraturas, por exemplo) e remodelamento. A DMO tem sido usada como o melhor padrão de medida, pois é responsável por aproximadamente 70% da resistência óssea (SUH & LYLES¹⁰¹, 2003).

Blake & Fogelman⁹ (2002) ressaltam que deveria ser notado que a definição de osteoporose não requer um indivíduo com ocorrência de fratura anterior ao diagnóstico da osteoporose, mas introduz o conceito de baixa massa óssea e a sua correlação com o risco aumentado de fraturas. Definem a doença baseando-se essencialmente num fator de risco, que é a baixa densidade óssea e afirmam que não há nada mais lógico que isso, já que as fraturas tendem a ocorrer posteriormente no desenvolvimento da doença, quando a integridade esquelética já está severamente comprometida.

A osteoporose pode ser primária ou secundária. A osteoporose primária ocorre em decorrência da privação estrogênica do climatério ou do próprio processo de envelhecimento. A osteoporose secundária, que conta com somente 5% dos casos de osteoporose, é

definida como resultante de condições clínicas ou uso de medicamentos que contribuem ou estão associados à osteoporose (BRANDÃO & HAUACHE¹⁶, 2005). As causas mais comuns da osteoporose secundária são uso excessivo ou crônico de corticosteróides, hipertireoidismo, assim como reposição inadequadamente alta de T4, alcoolismo, imobilização prolongada, distúrbios gastrintestinais, hipercalciúria, alguns tipos de neoplasias malignas e tabagismo (MANOLAGAS⁶³, 2000).

O climatério é a transição gradual da fase reprodutiva da mulher para a não-reprodutiva. No seu início (antes da menopausa), a atividade dos ovários declina, resultando em diminuição da produção de estrógeno e progesterona. A menopausa, última menstruação do ciclo reprodutivo, decorre da falência de esteróides ovarianos, ocorrendo ao redor dos cinquenta anos (TEIXEIRA¹⁰³, 2006).

Homens e mulheres iniciam a perda óssea por volta dos quarenta anos, porém, devido à deficiência de estrógeno, as mulheres experimentam uma fase de rápida perda óssea durante cinco a dez anos após a menopausa, podendo haver sobreposição da osteoporose devido à menopausa e devido ao envelhecimento em si. Nos homens há um declínio de esteróides sexuais lento e progressivo levando a uma perda óssea lenta e linear (MANOLAGAS⁶³, 2000).

Hormônios circulantes podem agir nas células esqueléticas modulando a síntese de fatores locais e favorecendo ligações protéicas com fatores de crescimento locais que por sua vez modulam a formação óssea ou a sua reabsorção. Durante a menopausa, sinais que estimulam a reabsorção óssea aumentam por causa de deficiência de estrógeno, com uma conseqüente ativação dos osteoclastos. Evidências indicam que tanto os osteoblastos como os osteoclastos sofrem apoptose ou morte celular programada. A apoptose nos osteoblastos pode explicar a falha na neoformação óssea, a chamada “osteopenia involutiva” que indivíduos idosos experimentam. Em pacientes idosos, a presença e a função dos osteoclastos diminui e os osteoblastos têm uma vida mais curta e menor

diferenciação. Estas alterações em células ósseas ocorridas na idade avançada que, associadas aos fatores físicos e nutricionais, induzem a osteoporose senil, que afeta ambos os sexos igualmente (HAGUENAUER et al.³⁷, 2001).

Riggs et al.⁸⁴ (2002) acrescentam fatores idade-dependentes que atuam secundariamente na osteoporose senil como o hiperparatireoidismo, prejuízo no metabolismo da vitamina D, inadequada ingestão de cálcio e deficiência nutricional de vitamina D, além da alteração na função dos osteoblastos.

A massa de tecido ósseo presente em qualquer tempo da vida adulta é o resultado da diferença entre a quantidade de osso acumulada até a maturidade, isto é, o pico de massa óssea, e a perda ocorrida (GENANT et al.³³, 1999). Esse pico de massa óssea cortical é atingido por volta dos 30-35 anos e 5-10 anos antes para o osso trabecular, sendo perdido, pelas mulheres, cerca de 0,5 a 1% de massa óssea ao ano, após os 35 anos (LEDFOURD et al.⁵⁷, 1998, SAMPSON⁸⁸, 2002). Os fatores que interferem favorecendo a patogênese da osteoporose são aqueles que prejudicam o acúmulo ósseo durante o crescimento e aqueles que aceleram a sua perda posteriormente (GENANT et al.³³, 1999).

Diante dos fatores responsáveis pela osteoporose, vistos sob uma perspectiva epidemiológica, o estrógeno é claramente um dos principais, mas outros fatores contribuem, mesmo que de forma ainda não bem quantificada, já que nem todas as mulheres na menopausa desenvolvem osteoporose (HARADA & RODAN³⁹, 2003). Dessa forma, seria desejável identificar fatores individuais de alto risco com a finalidade de instituir um tratamento preventivo da ocorrência de fraturas (BLAKE & FOGELMAN⁹, 2002).

Dos fatores que influenciam as chances de uma pessoa desenvolver osteoporose a genética é muito importante (TURNER & SIBONGA¹¹⁰, 2001) e explica 75% das variações de densidade óssea

idade-específicas (LEDFORD et al.⁵⁷, 1998).

Há vários genes suspeitos de influenciar geneticamente na osteoporose e entre deles incluem-se o gene para receptor de vitamina D (VDR), o do receptor de estrógeno (ER), o do colágeno tipo I alpha 1 (COLIA1) e o do receptor do PTH humano (PTHR1). O PTHR1 está relacionado com a análise de famílias osteoporóticas e o COLIA1 pode predispor às fraturas afetando a qualidade e quantidade ósseas (COMPSTON²⁰, 2001; MARIE⁶⁴, 2001).

Adicionalmente, o estilo de vida participa na manutenção da saúde esquelética. A ingestão adequada de cálcio e a prática de exercícios reduzem o risco de osteoporose, enquanto o fumo e a alta ingestão de álcool aumentam esse risco (TURNER & SIBONGA¹¹⁰, 2001).

A preservação esquelética proporcionada pelo estrógeno em mulheres pode estar evolutivamente relacionada à necessidade de reserva de cálcio para o desenvolvimento esquelético do embrião (HARADA & RODAN³⁹, 2003).

Os níveis de receptores de estrógeno (ER) em osteoclastos são baixos e os efeitos anti-reabsortivos do estrógeno são modulados mais indiretamente pela produção de fatores produzidos por células do microambiente ósseo que por efeitos diretos nos osteoclastos (COMPSTON²⁰, 2001).

Deficiência de estrógeno aumenta a produção de IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF (KIMBLE⁴⁹, 1997; COMPSTON²⁰, 2001; SCHEIDT-NAVE et al.⁸⁹, 2001), M-CSF e PGE₂. Essas substâncias aumentam a reabsorção óssea principalmente através do aumento no número de pré-osteoclastos na medula óssea, mas também do aumento da sobrevivência e atividade de osteoclastos (COMPSTON²⁰, 2001; RIGGS et al.⁸⁴, 2002).

A IL-6 tem atraído atenção especial pela evidência de que teria um importante papel na patogênese de diversas doenças caracterizadas por remodelação óssea acelerada e excessiva reabsorção óssea focal ou sistêmica. Esta citocina estimula a osteoclastogênese, não

sendo necessária para esta finalidade *in vivo* em condições fisiológicas normais, e sim em condições patológicas. Sua produção é estimulada em células da linhagem estromal ou osteoblástica por várias citocinas e fatores de crescimento (MANOLAGAS⁶³, 2000). Um estudo de Scheidt-Nave et al.⁸⁹ (2001) colocou a IL-6 sérica como o mais importante fator preditivo para perda óssea femoral entre mulheres com até dez anos de menopausa, sendo responsável por até 34% da variabilidade da DMO nesse osso.

Atualmente a regulação da reabsorção feita pelo estrógeno está sendo reavaliada por causa da descoberta da OPG, RANK e RANK-L. O estrógeno aumenta a produção, pelos osteoblastos, de OPG, um receptor solúvel que se liga ao RANK-L, e diminui a formação de M-CSF e RANK. Parte destes efeitos estrogênicos ocorre indiretamente, através dos intermediários estimulados pelo estrógeno. Assim, IL-1 e TNF- α aumentam RANK-L, OPG e M-CSF, enquanto PGE₂ aumenta o RANK-L e diminui a OPG (RIGGS et al.⁸⁴, 2002).

Recentemente, um estudo de Muthusami et al.⁶⁷ (2005) demonstrou que a deficiência estrogênica leva à significativa queda na quantidade de enzimas antioxidantes no fêmur de ratas ovariectomizadas, diminuindo a resistência das células ósseas ao stress oxidativo. Essa queda das defesas antioxidantes leva ao aumento de H₂O₂, que irá essencialmente promover o recrutamento de TNF- α para a indução de perda óssea, aumentando a diferenciação e função de osteoclastos.

A ação do estrógeno nos osteoblastos é controversa, evidências sugerem aumento na formação, diferenciação, proliferação e função de osteoblastos (RIGGS et al.⁸⁴, 2002). Inúmeros efeitos induzidos pelo estrógeno tem sido descritos como a indução de IGF-I, TGF- β e aumento da expressão de RNAm para BMP-6. Ele também aumenta a expressão de receptores para 1,25(OH)₂vitamina D, hormônio de crescimento (GH) e progesterona (COMPSTON²⁰, 2001).

Nas mulheres, a menopausa natural ou cirúrgica é

seguida por um período de acelerada remodelação óssea, com taxas de formação e reabsorção aumentadas (KIMBLE⁴⁹, 1997). Deficiência de estrógeno afeta a remodelação de várias maneiras, primeiro aumenta a frequência de ativação das BMUs, levando a uma maior remodelação e segundo, induz um desequilíbrio na remodelação prolongando a fase reabsortiva, reduzindo a apoptose de osteoclastos e encurtando a fase formativa aumentando a apoptose de osteoblastos. Como consequência destas mudanças, o volume reabsorvido nas lacunas de reabsorção está aumentado, em relação à capacidade de preenchimento destas lacunas pelos osteoblastos. A reabsorção aumenta em 90% durante a menopausa, enquanto a formação só aumenta 45% (RIGGS et al.⁸⁴, 2002).

Com a remodelação acelerada, lacunas de reabsorção podem ter sua profundidade aumentada levando a perfuração e perda de elementos trabeculares. Como as trabéculas são parte de uma estrutura integral, a perda de porções desta estrutura, levando a falta de conectividade de elementos estruturais, pode comprometer a resistência mecânica do osso. A continuação de ciclos de remodelação com deficiência de formação óssea em relação à reabsorção irão finalmente levar à redução da massa óssea (KIMBLE⁴⁹, 1997).

Exames histomorfométricos de osso transilíaco biopsiado identificaram defeitos microestruturais que, sob a luz do que se é conhecido sobre propriedades mecânicas e estruturais dos materiais, comprometerão futuramente a resistência óssea. Em mulheres durante a menopausa e com osteoporose estabelecida, um déficit tanto na espessura cortical, quanto no volume do osso trabecular tendem a ser substancialmente reduzidos. Muito do déficit de osso trabecular pode ser atribuído mais à perda de elementos trabeculares inteiros e descontinuação da conectividade trabecular do que à diminuição da espessura destes. A diminuída massa óssea da osteoporose pós-menopáusia é predominantemente um déficit de osso cortical. A perda

de osso cortical envolve alargamento dos espaços medulares às custas da estrutura cortical havendo trabeculação em superfícies corticoendosteais (BARGER-LUX & RECKER⁸, 2002).

Logo após a menopausa a perda óssea é predominantemente trabecular, seguindo-se, depois, a cortical (BANDEIRA et al.⁷, 2000). A perda óssea que se segue no período de cinco a dez anos que seguem a última menstruação pode ser de 2 a 4% ao ano para osso trabecular e de 1% ao ano para osso cortical (RADOMINSKI et al.⁸¹, 2002).

A relação entre volume ósseo e superfície metabolicamente ativa é um dos fatores que definem a atividade metabólica. Mesmo representando 20-25% do volume ósseo total, o osso trabecular contribui com mais de 60% de toda área de superfície óssea (RESNICK et al.⁸³, 1995) e é mais ativo metabolicamente que o cortical, fornecendo suprimento inicial nos estados de deficiência mineral e sendo perdido mais rapidamente na osteoporose pós-menopáusicas. Nos indivíduos mais idosos outros fatores afetam de modo progressivo, durante várias décadas e menos intensamente, ocasionando perdas ósseas envolvendo tanto o osso trabecular como o cortical, sendo maior a perda cortical (BANDEIRA et al.⁷, 2000) que irá ser responsável pelas fraturas osteoporóticas de fêmur e rádio distal (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003).

Barger-Lux & Recker⁸ (2002) concordam que a atividade metabólica e a superfície óssea são maiores no osso trabecular, mas afirmam que a perda óssea associada à ocorrência de fraturas não é uma perda desproporcional de osso trabecular já que este conta somente com 20% da massa óssea total. Na osteoporose a DMO chega a ser 30% menor que em mulheres saudáveis e mesmo que ocorra uma perda de 50% da massa óssea trabecular, essa perda levaria a somente 10% de perda óssea total.

As mulheres perdem, durante toda a sua vida, aproximadamente 50% do osso trabecular e 35% do osso cortical obtidos no pico de massa óssea (TURNER & SIBONGA¹¹⁰, 2001).

Durante a vida adulta, o tamanho dos ossos varia continuamente através da expansão das suas dimensões externas. Esta expansão perióstica é menor que o aumento do espaço medular resultante da reabsorção e gera diminuição da espessura cortical e aumento da sua porosidade (RIZZOLI & BONJOUR⁸⁶, 1999).

Para Barger-Lux & Recker⁸ (2002), o acúmulo de microlesões e/ou defeitos trabeculares poderiam enfraquecer o osso mais do que poderia ser explicado pela deficiência de massa óssea. As microfraturas ocultas indicam um aumento no risco de três a cinco vezes de fraturas osteoporóticas (RADOMINSKI et al.⁸¹, 2002).

A osteoporose afeta 40% das mulheres brancas após os quarenta anos de idade e 15% dos homens com mais de cinquenta anos de idade (LEDFOURD et al.⁵⁷, 1998).

Segundo a *National Osteoporosis Foundation* (NOF⁷³, 2004), 80% das pessoas afetadas pela osteoporose são mulheres. Das pessoas afetadas pela doença, uma em cada duas mulheres e um em cada quatro homens terão fraturas relacionadas à osteoporose durante a sua vida, levando a uma ocorrência de 1,5 milhões de fraturas anualmente. Um histórico de fraturas atraumáticas também tem sido incluído na definição de osteoporose tornando possível diagnosticá-la clinicamente (SUH & LYLES¹⁰¹, 2003).

As fraturas osteoporóticas mais importantes são as de vértebras, colo de fêmur e rádio distal (BANDEIRA et al.⁷, 2000). Existem proporções diferentes de osso cortical e trabecular nesses sítios freqüentes de fraturas. A coluna lombar, o rádio distal e o colo do fêmur têm 66%, 25% e 25% de osso trabecular, respectivamente (GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003). As fraturas de vértebra ocorrem mais cedo, por volta dos cinquenta e sessenta anos de idade, pois refletem perda óssea

predominantemente trabecular. As microfraturas de vértebras são geralmente assintomáticas, porém os pacientes que as apresentam têm maior chance de evoluir para fraturas completas com dor significativa e diminuição da mobilidade. As fraturas femorais ocorrem após os sessenta anos, aumentando exponencialmente na oitava década e são as mais graves, pois reduzem a expectativa de vida em 12%, e pode-se associar com mortalidade, nos primeiros seis meses, de 20% (BANDEIRA et al.⁷, 2000; RADOMINSKI et al.⁸¹, 2002; GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003). A mortalidade subsequente a fraturas femorais se deve em grande parte por doenças crônicas, enquanto que as fraturas vertebrais aumentam o risco de doenças pulmonares. A morbidade, a mortalidade e os custos são os maiores resultados negativos provenientes das fraturas osteoporóticas (SUH & LYLES¹⁰¹, 2003).

A osteoporose é uma doença que tem despertado grande interesse em Saúde Pública, pois com o crescimento e envelhecimento da população mundial, o número de pessoas idosas que se encontram na faixa de risco para fraturas e mesmo a incidência idade-específica está aumentando consideravelmente (KOWALSKI et al.⁵³, 2001). A longevidade aumentada associada ao aumento dos nascimentos ocorridos após a Segunda Guerra Mundial irá aumentar o número de americanos com risco de osteoporose nas próximas duas décadas (TURNER & SIBONGA¹¹⁰, 2001). No Brasil, estima-se que a proporção de idosos (maior de 65 anos) saltará de 5,1%, em 2000, para 14,2%, em 2050. Um levantamento constatou que a proporção de mulheres acima dos 65 anos que vivem sozinhas vem aumentando. Alcançou 14,9% em 1989 e dessas, 60% possuíam renda inferior ou igual a um salário mínimo. Dentre as pacientes maiores de setenta anos, 17,6% moravam sozinhas. Caso sofressem algum tipo de fratura, as pacientes do estudo atual enfrentariam basicamente dois problemas. Primeiro, a precariedade de recursos financeiros para seu tratamento (somente 21% tinham emprego remunerado e 43% tinham renda familiar mensal entre um e três

salários mínimos) e segundo, teriam dificuldades para desempenhar as atividades da vida diária (KOWALSKI et al.⁵³, 2001). Cooper²² *apud* Kowalski et al.⁵³ (2001) relatou que um ano após a fratura de quadril, 40% das pacientes estudadas ainda não estariam aptas a caminhar sem auxílio e 60% teriam dificuldades em realizar ao menos uma atividade da vida diária como se vestir, banhar-se ou preparar sua alimentação.

2.3 Modelos experimentais de osteoporose

Animais de laboratório têm a maior participação nos avanços sem precedentes ocorridos recentemente sobre o conhecimento da osteoporose (TURNER et al.¹⁰⁹, 2001).

Em 1995, a FDA (*Food and Drug Administration*) criou um *guideline* para avaliação pré-clínica e clínica de agentes usados para o tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopáusia recomendando a avaliação desses agentes em duas espécies animais, incluindo ratas ovariectomizadas e em um segundo animal não-roedor, preferivelmente um primata ovariectomizado, e reconheceu que nenhum modelo animal mimetiza precisamente a condição humana da osteoporose (THOMPSON et al.¹⁰⁵, 1995).

Nenhum animal reproduz fielmente a condição humana em parte porque o risco de fratura não pode ser reproduzido em animais (WALSH et al.¹¹⁶, 1997; TURNER et al.¹⁰⁹, 2001; EGGERMAN et al.³⁰, 2005).

Uma das principais considerações na utilidade de um modelo animal é a capacidade de prever um resultado em humanos, avaliando a similaridade dos eventos. Também são relevantes na avaliação de um bom modelo animal a praticidade, o custo e a disponibilidade desses animais, além de questões éticas (TURNER et

al.¹⁰⁹, 2001, EGGERMANN et al.³⁰, 2005).

Roedores, cachorros, macacos e gorilas são os principais animais usados como modelo de osteoporose (TURNER et al.¹⁰⁹, 2001). Cachorros não mostram diferenças na DMO após ovariectomia e os primatas têm uma perda de 1,4 desvios-padrão quando comparados a animais saudáveis de controle. Assim, medidas adicionais como uso de esteróides e dieta são necessários para induzir perda óssea significativa (EGGERMANN et al.³⁰, 2005).

Os ratos são os animais usados com mais frequência como modelo experimental de osteoporose (JEE⁴⁴, 1995; SZEJNFELD¹⁰², 2000; NAMKUNG-MATTHAI et al.⁶⁹, 2001; TURNER¹⁰⁸, 2001; TURNER et al.¹⁰⁹, 2001; EGGERMANN et al.³⁰, 2005) porque têm preço e manutenção baixos, crescem rapidamente, têm uma vida relativamente curta, têm esqueleto bem caracterizado, são altamente disponíveis e fornecem excelente modelo para muitos dos fatores de risco de osteoporose. Suas desvantagens são o pequeno volume sangüíneo, seu tamanho, a mínima remodelação cortical e a menor contribuição de osso trabecular para a massa óssea total onde grandes perdas trabeculares podem resultar em relativamente pequena perda óssea total (TURNER et al.¹⁰⁹, 2001). Acrescenta-se ainda a ausência de prejuízo à função osteoblástica em estágios tardios da deficiência estrogênica (TURNER¹⁰⁸, 2001; EGGERMANN et al.³⁰, 2005).

Segundo Jee⁴⁴ (1995), ratas ovariectomizadas como modelo perda óssea por deficiência de estrógeno têm sido empregadas por muitos e parecem ser o “padrão de ouro” para a perda óssea trabecular por deficiência estrogênica, mesmo diante da deficiência deste modelo pela ausente ou lenta perda óssea cortical.

Kalu⁴⁶ (1991) afirma que a ovariectomia em ratos induz uma perda óssea com muitas características similares à perda óssea pós-menopáusicas. Essas características incluem: aumento na remodelação óssea com a taxa de reabsorção maior que a de formação; uma rápida

fase inicial de perda óssea seguida de uma fase de perda mais lenta; maior perda óssea trabecular que cortical; alguma proteção da perda óssea pela obesidade; queda da absorção intestinal de cálcio e resposta similar a tratamentos com estrógenos, bifosfonatos, tamoxifeno, calcitonina, paratormônio e exercícios. Esta vasta similaridade é forte evidência de que o modelo de perda óssea em ratos é possível de ser utilizado para o estudo de problemas relevantes na perda óssea pós-menopáusia.

A observação de que deficiência hormonal ovariana aguda leva a elevada remodelação em osso trabecular eleva o interesse no rato como modelo de perda óssea pós-menopáusia (TURNER et al.¹⁰⁹, 2001; EGGERMANN et al.³⁰, 2005).

Alguns autores salientam que o rato deve ser descrito como um modelo da perda óssea que ocorre inicialmente após a menopausa e não como modelo de osteoporose, e que a perda óssea do rato ovariectomizado deve ser considerada uma osteopenia, não uma osteoporose (KALU⁴⁶, 1991; TURNER¹⁰⁸, 2001). Mamíferos não-primatas não entram em menopausa espontânea, mas através da ovariectomia (OVX) em ratos pode-se chegar a marcante osteopenia (WALSH et al.¹¹⁶, 1997; SZEJNFELD¹⁰², 2000).

Após a realização da OVX os ratos mostram uma perda óssea bifásica, com uma rápida fase inicial de perda até os 100 dias seguida de um período intermediário de relativa estabilização do osso trabecular em um nível osteopênico. Após 270 dias, uma lenta fase de perda óssea ocorre, com queda da quantidade de osso trabecular (KALU⁴⁶, 1991; EGGERMANN et al.³⁰, 2005). Mesmo causando uma menor redução da DMO em ratos quando comparado com humanos, a OVX leva a uma queda das propriedades mecânicas do osso que se mostra de magnitude similar (EGGERMANN et al.³⁰, 2005).

Para Namkung-Matthai et al.⁶⁹ (2001), quando os ratos são alimentados com uma dieta pobre em cálcio (*low-calcium diet* – LCD)

a queda da absorção de cálcio aumenta significativamente a perda óssea. Estes autores afirmam que após a OVX aos dois meses de idade e com LCD a osteoporose foi confirmada nas ratas aos cinco meses de idade através da medida da densidade mineral óssea vertebral e femoral usando DEXA e animais *sham* para cálculo do T-score.

Ratas têm perda óssea trabecular na tíbia proximal e em vértebras lombares após OVX por um mecanismo de desequilíbrio da remodelação óssea. Thompson et al.¹⁰⁵ (1995) encontraram, no 14º dia após a OVX, um aumento da remodelação óssea, estreitamento e perda de elementos trabeculares. Esses autores indicam que ratos em crescimento respondem com uma perda óssea mais rápida e em maior magnitude que ratos adultos após OVX. Após oito meses da OVX havia perda óssea trabecular nas tíbias proximais de 10% para ratos adultos (19 meses de idade) enquanto que ratos jovens (cinco meses de idade) perdiam 14% de osso trabecular após quatro meses de OVX, com um aumento de 3,5 vezes na remodelação óssea. Após 12 meses de OVX verificaram que a remodelação retornava a valores comparáveis aos valores do grupo *sham* e sugeriram que estudos de agentes com potencial terapêutico na OVX fossem restritos à duração de menos de 12 meses, período correspondente a quatro anos em humanos, e com a OVX realizada em animais de três meses de idade e ainda, provavelmente, estudos deveriam ser feitos com não mais que seis meses de duração após a OVX.

O reconhecimento de um modelo animal apropriado fornece informações sobre a qualidade e estrutura ósseas que não são obtidas em pacientes participantes de estudos clínicos. Modelos animais de osteoporose são imprescindíveis para a antecipação sobre a eficácia e segurança de tratamentos em relação à qualidade óssea (THOMPSON et al.¹⁰⁵, 1995).

2.4 Reparação óssea

Os aspectos de maior interesse de aplicação ortopédica são a fragilidade óssea, a eficácia da fixação de implantes e a reparação óssea (EGGERMANN et al.³⁰, 2005). A reparação óssea é um dos assuntos de estudo mais urgentes numa sociedade que envelhece (MAEDA et al.⁶¹, 2004) porque uma reparação de fratura prejudicada pode aumentar dramaticamente a morbidade de pacientes idosos (TURNER et al.¹⁰⁹, 2001).

Ao lado de seu excelente comportamento mecânico, o osso exibe um potencial inigualável para regeneração. O osso é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais com tecido regenerado com uma organização estrutural altamente semelhante, sem deixar cicatriz (SCHENK⁹⁰, 1996).

Trowbridge & Emling¹⁰⁷ (1996) afirmam que a reparação de fraturas ósseas segue os mesmos princípios da reparação no tecido conjuntivo ou em outros tecidos mesenquimais, diferenciando-se apenas pela formação de um tecido calcificado especializado.

A reparação tecidual inicia-se com a hemostasia, formação do coágulo e de uma resposta inflamatória aguda com remoção de tecido necrótico, restos celulares e formação de uma base provisória, constituída, primeiramente, de uma malha de fibrina-fibronectina, para a migração de células adjacentes à ferida, que invadem e iniciam a repopulação da lesão. Em seguida, acontecem fenômenos de angiogênese e formação de tecido de granulação (DANTAS²⁷, 2000). Os fibroblastos secretam colágeno e o tecido de granulação transforma-se em tecido conjuntivo fibroso que se interpõe no local da fratura levando à formação de um calo fibroso temporário que, em geral, está totalmente formado em uma a duas semanas. O calo fibroso é substituído por tecido osteóide, que se calcifica e forma o calo ósseo, formado por células

provenientes do perióstio e endóstio ou, freqüentemente, há formação de cartilagem que precede a formação de tecido ósseo no calo. O calo ósseo primitivo é formado por um tecido ósseo fibrilar grosseiro, sendo substituído por um tecido ósseo lamelar maduro (calo secundário) num processo lento que pode durar de meses até anos (TROWBRIDGE & EMLING¹⁰⁷, 1996). A remodelação do calo ósseo acontece por reabsorção osteoclástica e subsequente osteogênese converte esse osso primário em osso cortical, restaura a forma e a integridade mecânica do osso fraturado (SIMON et al.⁹⁶, 2002).

O mecanismo desse padrão reparador é muitas vezes considerado como uma recapitulação da osteogênese embriológica e do crescimento (SCHENK⁹⁰, 1996), com exceção da fase inflamatória inicial. A hipóxia tecidual localizada, o coágulo e a inflamação ocorridos no local de uma fratura, assim como a franca remodelação do calo em estágios posteriores da reparação são respostas únicas, não havendo correspondente durante o desenvolvimento esquelético (SIMON et al.⁹⁶, 2002).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário; e o maduro, secundário ou lamelar. O tecido primário é o que aparece primeiro tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação de fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário. No tecido primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, há menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos. Porém, no tecido ósseo secundário ou lamelar essas fibras se organizam em lamelas paralelas ou concêntricas separadas por uma substância cimentante que consiste em matriz mineralizada, porém com muito pouco colágeno (LI et al.⁵⁹, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004). Essa fase de maturação e remodelação do calo ósseo, a fase final da reparação, é a mais longa, depende da taxa de remodelação e varia em diferentes espécies. Geralmente, em humanos, ela leva de um a quatro anos e, 32 semanas

no cachorro para a completa substituição do calo por osso lamelar funcionalmente competente. No rato este tempo ainda é incerto (LI et al.⁵⁹, 2001).

Li et al.⁵⁹ (2001) sugerem que a reparação total de uma fratura seja considerada completa somente quando não houver mais evidências radiográficas da linha de união dos fragmentos ósseos fraturados, quando acontecer a restauração total da arquitetura óssea histologicamente e quando o osso neoformado recuperar integralmente sua resistência mecânica.

A formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis: suprimento vascular amplo e suporte mecânico. Estes princípios enfatizam o padrão de desenvolvimento ósseo inicial: na ossificação direta ou intramembranosa, o tecido conjuntivo serve como molde para a deposição óssea. O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimatosas que se transformam em grupos de osteoblastos, sintetizam osteóide que logo se mineraliza, englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Vários desses grupos se formam havendo confluência das traves ósseas formadas, dando ao osso um aspecto esponjoso, com cavidades entre as traves penetradas por vasos sangüíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas, que irão dar origem à medula óssea. Durante a ossificação indireta ou endocondral, a cartilagem serve como base sólida que primeiramente será coberta e depois substituída por osso. Os condrócitos sofrem hipertrofia e apoptose sendo suas cavidades posteriormente invadidas por vasos sanguíneos e células osteogênicas vindas do tecido conjuntivo adjacente. Estas células se diferenciam em osteoblastos e depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada, que servem de apoio à ossificação. A ossificação endocondral não ocorre em defeitos que não estão associados com uma fratura, nem em fraturas que se reparam sob condições estáveis (SCHENK⁹⁰, 1996; JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁵, 2004).

Qualquer lesão óssea (fratura, defeito, fixação de implantes, interrupção do suprimento sangüíneo) ativa a regeneração óssea local pela liberação de fatores de crescimento e indutores. O osso é, de fato, uma das fontes mais ricas em fatores de crescimento (SCHENK⁹⁰, 1996).

Certos fatores de crescimento que promovem a reparação foram identificados. Estes regulam várias atividades celulares como a proliferação, diferenciação e migração celular, além da síntese protéica e da atividade secretora. Alguns deles são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), TGF- α e - β e a IL-1 (TROWBRIDGE & EMLING¹⁰⁷, 1996).

A osteoporose muda o curso da reparação óssea através da diminuição da velocidade de formação do calo ósseo e da sua quantidade (EGGERMANN et al.³⁰, 2005).

Modelos animais com roedores são freqüentemente utilizados para examinar a reparação de fraturas femurais, tibiofibulares ou fibulares (WALSH et al.¹¹⁶, 1997).

Walsh et al.¹¹⁶ (1997) fizeram um estudo mecânico e histológico de fraturas femurais fechadas, além do conteúdo mineral femural, em ratas ovariectomizadas aos três meses de idade. As fraturas foram realizadas seis semanas após a OVX e analisadas após dez dias, duas, quatro e seis semanas. Aos dez dias, os calos nos animais OVX mostravam mais tecido mesenquimal indiferenciado e trabéculas ósseas mais delgadas que os animais controle. Na segunda e quarta semanas, permanecia o atraso da diferenciação no calo dos animais OVX em relação aos controles, pois, na quarta semana, persistia a cartilagem hialina enquanto que os controles mostravam osso maduro lamelar. Após seis semanas, os calos dos animais controle e OVX eram similares, com predominância de osso trabecular bem formado. Diferenças na resistência à flexão foram verificadas na quarta semana refletindo a pobre qualidade

óssea e a menor quantidade de mineral ósseo, mas não foram detectadas na sexta semana. Este estudo em ratos revela que a ovariectomia, após curto período, pode prejudicar a reparação de fraturas femurais fechadas.

Namkung-Matthai et al.⁶⁹ (2001) usando ratas OVX e recebendo LCD estudaram fraturas femorais abertas e verificaram redução de 40% na área transversal e de 23% da DMO no osso do reparo dessas fraturas observados após 21 dias comparados ao grupo *sham*. Após a fratura, no sétimo dia o grupo *sham* apresentava formação óssea enquanto o grupo OVX apresentava uma larga faixa de tecido fibroso. Ao final de três semanas o grupo *sham* mostrava que a ossificação endocondral havia progredido e mostrava extensas áreas de osso lamelar sendo remodelado enquanto que o grupo OVX mostrava condrócitos hipertróficos no início da ossificação. A histomorfometria revelou um atraso na reparação do calo com pobre desenvolvimento de osso maduro nas ratas OVX, indicando atraso na diferenciação celular.

O reparo de defeitos ósseos é um bom modelo para o estudo da regeneração óssea. Ao contrário das fraturas, os defeitos são menos propensos a fatores mecânicos e obstruções do suprimento sanguíneo. Portanto, a reparação de defeitos ósseos em animais tem sido amplamente utilizada em experimentos que visam pesquisar os efeitos de técnicas cirúrgicas e fármacos na mesma (SCHENK⁹⁰, 1996).

A quantidade e qualidade do osso reparado em condições experimentais são influenciadas pela espécie animal, idade, localização anatômica, envolvimento cortical (mono ou bicortical), presença de perióstio ou dura-máter e estabilidade do defeito (ALKAN¹ et al., 2002).

Defeitos ósseos reparam por nova formação óssea e uma incompleta reparação acontece na maioria dos casos devido a rápido crescimento de tecido conjuntivo para dentro do defeito a partir das margens da lesão e defeitos monocorticais podem evitar este problema (ALKAN¹ et al., 2002).

Estudos examinaram a cicatrização de orifícios criados

em coelhos revelaram que orifícios com o diâmetro na ordem dos osteônios (0,2mm) são concentricamente preenchidos por osso lamelar. Em orifícios maiores, uma estrutura de osso embrionário é formada e depois o osso lamelar é depositado nos espaços intertrabeculares neoformados. O osso embrionário é formado mais rapidamente que o osso lamelar, e o intervalo entre o depósito de matriz osteóide e a mineralização é curto, de um a três dias. Comparada ao osso embrionário, a formação do osso lamelar ocorre lentamente (SCHENK⁹⁰, 1996).

Numerosos estudos têm avaliado o conceito de defeito de tamanho crítico. Um defeito de tamanho crítico é aquele que não se repara durante toda a vida do animal, mas como a maioria dos estudos não se estende durante toda a vida do animal, o conceito experimental refere-se àquele defeito que não se repara durante a duração do estudo (GOSAIN et al.³⁵, 2000).

Prado et al.⁸⁰ (2003) estudaram o tamanho crítico em defeitos ósseos localizados em tíbias de ratas. Para tanto, utilizaram ratos adultos nos quais foram confeccionados defeitos monocorticais de 2,3 ou 3,5mm de diâmetro. Os animais foram sacrificados aos 15, 30 e 45 dias após a confecção do defeito. A porcentagem da área óssea no centro do defeito foi avaliada através de planimetria por contagem de pontos e posterior análise estatística. Os autores verificaram fechamento linear em todos os grupos. Comparando os tamanhos de defeitos em cada período, não foi encontrada diferença estatística com relação à porcentagem óssea. Considerando o conceito de defeito de tamanho crítico, concluíram que nenhum dos tamanhos testados é crítico, porém, como não houve o preenchimento da área total, pode-se utilizar, com ressalvas, o modelo de defeito ósseo em tíbia de ratos. Dadas as semelhanças com relação ao reparo dos defeitos, os autores recomendaram o tamanho intermediário por questões de ordem prática.

Gosain et al.³⁵ (2000) sugeriram que medidas lineares

comumente usadas para análise do fechamento de defeitos ósseos podem não fornecer uma medida precisa da reparação destes como pode ser obtido através de análise da ossificação baseada no volume de osso depositado. Os autores encontraram resultados que mostram que defeitos parietais de 5mm de diâmetro em porquinhos-da-índia, classificados como de tamanho menor que o crítico pela análise da extensão linear, após 12 semanas, não ultrapassaram 40% de formação óssea quando analisados pela área, tornando-os maiores que o tamanho crítico para o mesmo período de estudo.

Estudos têm utilizado defeitos ósseos para avaliar a reparação óssea em tíbia de ratas ovariectomizadas (AMADEI³, 2004; SILVEIRA⁹⁵, 2004), com ou sem a influência de medicamentos.

2.5 Bifosfonatos

Existe atualmente uma variedade de tratamentos disponíveis para o controle da osteoporose. Agentes estimulantes de formação óssea como os fluoretos, o paratormônio e seus análogos têm sido considerados como uma opção de tratamento, por outro lado, os inibidores da reabsorção óssea, que incluem o cálcio, a vitamina D, a calcitonina, os esteróides gonadais e os bifosfonatos (BFs) têm mostrado prevenir a perda óssea ou reduzir a ocorrência de fraturas (NETELENBOS⁷⁴, 1998).

Os esteróides da terapia de reposição hormonal foram por muito tempo a primeira escolha terapêutica para o tratamento da osteoporose, mas esse quadro vem se modificando e autores mais recentes citam os bifosfonatos como o medicamento mais efetivo e usado para essa finalidade (LEU et al.⁵⁸, 2005; NANCOLLAS et al.⁷⁰, 2006).

Os BFs são análogos sintéticos e estáveis do pirofosfato

(P-O-P), uma substância presente no organismo com função de inibir a mineralização do osso. Nos BFs, o átomo de oxigênio central é substituído pelo carbono (Figura 1) e essa ligação P-C-P torna esses medicamentos quimicamente estáveis e resistentes à ação de ácidos e de enzimas hidrolíticas. Não há nenhuma enzima conhecida que seja capaz de clivar essa ligação (COMPSTON¹⁹, 1994; SZEJNFELD¹⁰², 2000; WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001; RODAN & RESZKA⁸⁷, 2003).

Em relação à farmacocinética, os BFs comungam de propriedades comuns. A absorção intestinal é pobre (<1 a 10%) e é inibida por cálcio ou outros íons bivalentes que quelam o bifosfonato. São rapidamente eliminados da circulação (meia-vida de 1 a 2 horas) e a ligação ao mineral ósseo é de 20 a 60%, sendo que o restante é eliminado pela urina (COMPSTON¹⁹, 1994; SZEJNFELD¹⁰², 2000; RODAN & RESZKA⁸⁷, 2003).

Os BFs são hidrofílicos e altamente solúveis em água e portanto, raramente penetram membranas biológicas dos tecidos moles. Essas mudanças físico-químicas também reduzem a susceptibilidade intrínseca do metabolismo do medicamento, promovendo excreção urinária ou biliar como substância inalterada (HIRABAYASHI & FUJISAKI⁴¹, 2003). Todos esses fatores contribuem para a excepcional ligação à superfície óssea, que combinada com a limitada capacidade de penetração celular explicam a intensa afinidade da ação dos BFs ao tecido ósseo e a vantajosa segurança desses medicamentos (RODAN & RESZKA⁸⁷, 2003).

O efeito colateral mais comum dos BFs são as esofagites. Cuidados devem ser tomados na administração para pacientes com insuficiência renal. Os BFs reduzem a concentração sérica de cálcio podendo causar hipocalcemia em pacientes com deficiência de vitamina D (RISEDRONATE⁸⁵, 2001; WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001).

O átomo de carbono dos BFs permite a adição de cadeias laterais, assim, substituições diferentes nas duas posições restantes do

átomo de carbono criaram diferentes BFs, cada um com propriedades farmacológicas, atividade na reabsorção óssea e potência diferentes, determinadas pela cadeia lateral (COMPSTON¹⁹, 1994; SZEJNFELD¹⁰², 2000; STEPAN et al.⁹⁸, 2003).

Em ordem crescente de potência e atividade anti-reabsortiva, os principais BFs são: etidronato, tiludronato, clodronato, pamidronato, alendronato e risedronato (COMPSTON¹⁹, 1994).

O etidronato, primeiro bifosfonato, teve vários usos, inclusive em produtos caseiros, como, por exemplo, no creme dental, na inibição ou bloqueio de depósito de cálcio e tártaro. Foi utilizado em calcificações heterotópicas após cirurgias de quadril, paraplegias e doença de Paget (SZEJNFELD¹⁰², 2000; CASTRO et al.¹⁸, 2004), pois quando em altas doses, inibe a mineralização do osso e cartilagem (COMPSTON¹⁹, 1994; SZEJNFELD¹⁰², 2000).

Recentemente, novos BFs foram desenvolvidos com o objetivo de dissociar os efeitos indesejáveis, na osteoporose, sobre a mineralização óssea daqueles desejados sobre a reabsorção óssea. Os derivados da amina parecem conferir alta potência, sem aumentar os efeitos sobre a mineralização óssea ou alterar sua afinidade pela hidroxiapatita. A atividade anti-reabsortiva pode ser aumentada adicionando-se cadeias laterais ao grupo amino ou por meio de substituições cíclicas, particularmente aquelas contendo nitrogênio no anel heterocíclico, como no risedronato (Figura 1) (SZEJNFELD¹⁰², 2000; CASTRO et al.¹⁸, 2004; NANCOLLAS et al.⁷⁰, 2006).

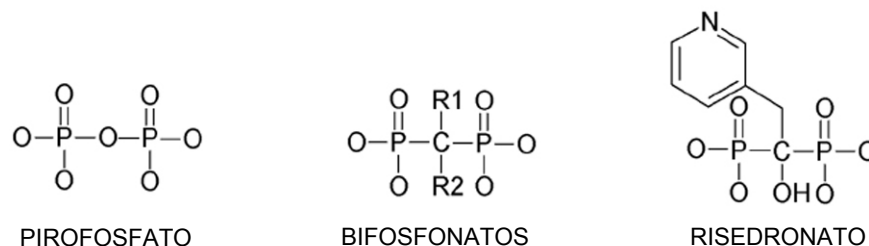


FIGURA 1 - Comparação entre as estruturas do pirofosfato, a básica dos bifosfonatos e a nitrogenada do risedronato.

A estrutura P-C-P também é responsável pela forte afinidade dos BFs ao osso e ligação à hidroxiapatita (SZEJNFELD¹⁰², 2000; WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001). Outros autores (HIRABAYASHI & FUJISAKI⁴³, 2003; CASTRO et al.¹⁸, 2004; NANCOLLAS et al.⁷⁰, 2006) complementam que os dois grupos fosfonatos atuam em conjunto com o grupo hidroxila ou amino da cadeia lateral (Figura 1) conferindo aumento da afinidade com a hidroxiapatita, permitindo direcionamento eficiente e rápido para a superfície óssea.

No estudo de Nancollas et al.⁷⁰ (2006), foi feita uma comparação entre a afinidade de ligação à hidroxiapatita de vários bifosfonatos e os autores demonstraram uma duração de ação mais prolongada do alendronato e zoledronato comparado a efeitos mais facilmente reversíveis do etidronato e risedronato. Estas diferenças de afinidade foram atribuídas à cadeia lateral não-hidroxila.

Estudos auto-radiográficos mostram a localização preferencial dos BFs marcados nas superfícies de reabsorção (SZEJNFELD¹⁰², 2000; RODAN & RESZKA⁸⁷, 2003) apoiando a idéia de que sua presença nessa região é necessária para a ativação adequada do osteoclasto (SZEJNFELD¹⁰², 2000). De fato, agentes osteotrópicos tendem a se acumular em certas regiões do tecido ósseo, não se distribuindo de forma homogênea e se concentrando em locais caracterizados por alta taxa metabólica, isto é, lugares de maior remodelação óssea. Na tíbia de ratos ele se concentra mais na epífise e

metáfise do que na diáfise (HIRABAYASHI & FUJISAKI⁴¹, 2003; STEPENSKY et al.⁹⁹, 2003).

O tempo de permanência dos BFs no organismo e ossos é longo, podendo durar dez anos ou mais, dependendo da velocidade de remodelação do tecido ósseo (SZEJNFELD¹⁰², 2000; STEPENSKY et al.⁹⁹, 2003). A meia-vida esquelética dos bifosfonatos em ratos parece não estar bem estabelecida. Para Li et al.⁵⁹ (2001) o alendronato permanece até duzentos dias enquanto Koivukangas et al.⁵⁰ (2003) relatam uma meia-vida esquelética de três a 12 meses para os bifosfonatos.

A primeira teoria sobre como os BFs atuariam retardando a reabsorção óssea era de que haveria inibição da dissolução dos cristais de hidroxiapatita via efeitos físico-químicos. Hoje se acredita que BFs mais potentes e administrados em doses menores atuem por mecanismos celulares, não físico-químicos (NANCOLLAS et al.⁷⁰, 2006).

O BF incorporado à matriz óssea é farmacologicamente inativo até ser liberado em um novo foco de reabsorção através da acidificação, enquanto que o resto do medicamento ligado ao osso em outros locais permanece praticamente quiescente (STEPENSKY et al.⁹⁹, 2003). Não está bem estabelecido se a ação do medicamento poderia ocorrer na margem apical dos osteoclastos, ou se o agente atua após sua internalização na célula, ou se o bifosfonato é liberado no fluido ósseo (SZEJNFELD¹⁰², 2000).

Após a liberação do medicamento do osso, esses agentes atingem novamente a circulação e uma parte será excretada, enquanto outra parte é reabsorvida ao osso (STEPENSKY et al.⁹⁹, 2003).

Grande parte dos autores relatam a ocorrência de internalização dos BFs pelos osteoclastos (CONSEJO²¹, 2000; IM et al.⁴², 2004), o que provocaria a perda de estruturas intracelulares implicadas na secreção de enzimas hidrolíticas e de H_3O^+ , necessários para a ação destrutiva dos osteoclastos sobre o tecido ósseo (CONSEJO²¹, 2000).

Existem teorias de que os dos BFs teriam efeitos sobre a

permeabilidade dos osteoclastos ao cálcio, acarretando as mudanças estruturais que vêm sendo observadas na borda em escova ou no citoesqueleto dessas células (SZEJNFELD¹⁰², 2000). Assim, inibiriam diretamente a atividade osteoclástica através da alteração do citoesqueleto modificando a morfologia celular, a borda em escova, a sinalização de integrinas e o transporte de endossomos (STEPAN et al.⁹⁸, 2003).

Os BFs podem ser agrupados em dois grupos, segundo o seu mecanismo de ação. Os mais fracos e mais parecidos com o pirofosfato, como o clodronato e o etidronato, podem ser metabolizados em análogos citotóxicos do ATP não-hidrolizáveis que serão então incorporados pelos osteoclastos levando-os à apoptose. Os mais potentes não são metabolizados e atuam na via do mevalonato (WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001; LEU et al.⁵⁸, 2006).

Os aminobifosfonatos reduzem a função dos osteoclastos inibindo a farnesil difosfato sintetase, uma enzima da seqüência de biossíntese do colesterol, pela via do mevalonato, requerida para a produção de geranylgeranyl difosfato. A geranylgeranyl difosfato liga proteínas à membrana celular por um processo chamado de isoprenilação de proteínas. A depleção desta enzima limita a prenilação de pequenas proteínas regulatórias que controlam a forma celular e a formação da borda em escova dos osteoclastos, resultando em prejuízo para a função dos osteoclastos (RODAN & RESZKA⁸⁷, 2003; STEPAN et al.⁹⁸, 2003).

Em nível celular, os aminobifosfonatos inibem a diferenciação e recrutamento de osteoclastos (COMPSTON¹⁹, 1994; SZEJNFELD¹⁰², 2000; STEPAN et al.⁹⁸, 2003), assim como a sua adesão à matriz mineralizada e reduzem seu tempo de vida pela ativação de caspases pró-apoptóticas (STEPAN et al.⁹⁸, 2003). A indução de apoptose leva a uma reduzida profundidade das lacunas de reabsorção, contribuindo para maior equilíbrio local de reabsorção e formação ósseas (PARFITT et al.⁷⁷, 1996).

Evidências recentes sugerem que os efeitos na reabsorção óssea são também mediados, pelo menos em parte, pela ação via osteoblastos (COMPSTON¹⁹, 1994). O bifosfonato estimulou a liberação de um fator de inibição de osteoclastos em culturas de osteoblastos de ratos (PARFITT et al.⁷⁷, 1996). Atuando na retração de osteoblastos de superfície e no recrutamento de osteoclastos e seus precursores, os BFs modificam a remodelação óssea através da diminuição da frequência de ativação de BMU (SZEJNFELD¹⁰², 2000).

BFs também inibem a produção de IL-6 em células humanas de osteossarcoma. Nos roedores, as células medulares são a maior fonte de IL-6 e sua produção pelos osteoblastos da superfície óssea poderia estar envolvida na origem de novas BMUs (PARFITT et al.⁷⁷, 1996).

O risedronato, terceira geração de BFs, é um piridil bifosfonato com potência mil vezes maior que a do etidronato como agente anti-reabsortivo (WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001) indicado para o tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopausa e da osteoporose induzida por corticosteróides em homens e mulheres, além da Doença de Paget (RISEDRONATE⁸⁵, 2000).

O risedronato é usado no tratamento da osteoporose pós-menopausa na dosagem de 5 mg diários, durante dois a três anos, e estudos de histologia óssea em mulheres com osteoporose tratadas com risedronato 5mg diário indicam que o osso formado durante o tratamento é de qualidade normal (RISEDRONATE⁸⁵, 2001).

Os primeiros BFs atuavam primariamente em osso trabecular e eram menos efetivos na prevenção de perda de osso compacto e em fraturas de fêmur (LANE et al.⁵⁵, 1996). Já o tratamento da osteoporose pós-menopausa com risedronato resulta em aumento da DMO (LANE et al.⁵⁵, 1996; EASTELL²⁹, 1998, HARRIS et al.⁴⁰, 1999; FOGELMAN et al.³¹, 2000; WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001) e em decréscimo do número de fraturas tanto vertebrais como não-vertebrais (LANE et

al.⁵⁵, 1996; EASTELL²⁹, 1998, HARRIS et al.⁴⁰, 1999; WOO & ADACHI¹¹⁸, 2001). Tratamentos de três anos de duração levaram a um aumento médio de 5,4% na DMO das vértebras lombares e de 3,3% e 1,6% no trocânter e colo de fêmur, respectivamente. A respeito de redução de fraturas vertebrais, os valores oscilam entre 40 e 50% e, no caso de fraturas não-vertebrais há redução de 33 a 40% (CONSEJO²¹, 2000).

Recente estudo (ITO et al.⁴³, 2005) com ratos ovariectomizados verificou que muito da eficácia do risedronato explicada somente pelo aumento da DMO e da massa óssea também está relacionada com a sua capacidade, em doses superiores a 0,5mg/kg, de aumentar a resistência óssea através da alteração da microarquitetura e do aumento da conectividade de trabéculas, alterações que se mostraram altamente correlacionadas com a melhora das propriedades biomecânicas do osso, obtendo resultados superiores aos animais *sham*.

Para Borah et al.¹³ (2005), um dos mecanismos dos BFs que promovem a redução do risco de fratura é o aumento da mineralização do osso. Quando há elevada remodelação óssea o tempo de vida de uma BMU é curto, resultando em osso neoformado parcialmente mineralizado, comprometendo as propriedades biomecânicas do osso. Pela redução da remodelação ocasionada pelos BFs é possível aumentar o tempo de vida da BMU e reduzir o seu número, proporcionando uma mineralização secundária com o decorrer do tempo. Estes autores confirmaram essa mineralização aumentada em pacientes usando risedronato, por três anos, através de microtomografia computadorizada com radiação *synchrotron*.

Boonen et al.¹² (2004) estudaram o risedronato usando mulheres de oitenta anos ou mais, com osteoporose, e demonstraram que, após um ano de uso do risedronato, houve redução de fraturas vertebrais em 81% quando comparado a mulheres que receberam placebo. Eles também verificaram que o risedronato é bem tolerado, não mostrando, neste estudo, aumento de sintomas gastrintestinais.

Um estudo comparativo macroscópico e histológico dos aminobifosfonatos (pamidronato, alendronato e risedronato) mostrou que o risedronato exibiu efeitos gástricos mais favoráveis e seguros que os aminobifosfonatos primários (BLANK et al.¹⁰, 1997). Outros estudos atestaram a boa tolerabilidade do risedronato quando comparado a placebos (HARRIS et al.⁴⁰, 1999; FOGELMAN et al.³¹, 2000; McCLUNG et al.⁶⁵, 2001). Os achados de Kanatsu et al.⁴⁷ (2004) demonstraram que, embora o risedronato possua efeitos irritativos e de prejuízo à cicatrização de lesões estomacais pré-existentes, seus efeitos são muito menos pronunciados que os do alendronato.

Cao et al.¹⁷ (2002) sugeriram que a ação dos bifosfonatos inibindo a reabsorção óssea e diminuindo substancialmente a remodelação óssea leva a um efeito secundário e bastante proeminente de supressão da atividade de formação óssea tanto em ratos como em mulheres. No entanto, seus estudos com ratas OVX, assim como outros em animais não castrados (LI et al.⁶⁰, 1999; LI et al.⁵⁹, 2001), demonstraram que, na verdade, os BFs (incadronato, clodronato, pamidronato e alendronato) não impedem a iniciação da reparação de fraturas e a formação do calo ósseo, mas o uso contínuo desses medicamentos, especialmente em altas doses, impede fortemente o processo de remodelação do calo e a substituição do osso primário por osso lamelar por causa da inibição da atividade de osteoclastos, célula importante neste processo. Também verificaram uma maior mineralização no calo ósseo dos animais tratados com os BFs (CAO et al.¹⁷, 2002).

Os efeitos dos BFs sobre a formação óssea e, mais particularmente, sobre os osteoblastos e seus precursores vêm sendo investigados por vários autores (D'AOUST et al.²⁵, 2000; IM et al.⁴², 2004; NAGASHIMA et al.⁶⁸, 2005; VON KNOCH et al.¹¹⁴, 2005). Sugere-se que os BFs devem ter um efeito estimulante sobre osteoblastos (IM et al.⁴², 2004).

D'Aoust et al.²⁵ (2000) encontraram sinais de maior

promoção da diferenciação de osteoblastos em defeitos criados na calvária de ratos tratados com etidronato do que em animais controle. Neste estudo o etidronato acelerou a formação de tecido osteóide e também mineralizado, além de estimular maior porcentagem de área de preenchimento do defeito.

Im et al.⁴² (2004) observaram aumento da proliferação de osteoblastos em culturas primárias de células ósseas humanas tratadas com alendronato e risedronato em relação ao controle. Efeitos sobre a maturação de osteoblastos foram observados através da expressão da fosfatase alcalina, sinal precoce de diferenciação celular de osteoblastos em culturas, que estava aumentada nas células tratadas. Também houve aumento da expressão de BMP 2, colágeno tipo I e osteocalcina. Os autores sugerem que o efeito anabólico dos BFs seja via aumento da BMP 2 e outras proteínas ósseas morfogenéticas.

Estudo similar de Von Knoch et al.¹¹⁴ (2005) com cultura de células ósseas com origem na medula óssea tratadas com risedronato, zoledronato e alendronato pesquisou e encontrou aumento da expressão de fosfatase alcalina, colágeno tipo I e sialoproteína óssea tipo II em células tratadas. O aumento de expressão dessas substâncias ocorreu de forma dependente do tempo e tipo de tratamento, tendo o zoledronato e efeito mais potente na promoção da proliferação e diferenciação de osteoblastos.

Para Nagashima et al.⁶⁸ (2005) a ação do risedronato na formação óssea de defeitos femorais em ratos foi bimodal, estimulatório no desenvolvimento de células osteogênicas para a formação de osso primário e inibitório na diferenciação terminal de osteoblastos na remodelação e maturação final do osso, com conseqüente atraso na formação de osso lamelar cortical. Dai et al.²⁶ (2004) relataram o importante papel dos osteoclastos na regulação da formação óssea osteoblástica, particularmente no desenvolvimento de matriz óssea lamelar.

2.6 Homeopatia

A medicina alternativa é definida como qualquer dos sistemas médicos de diagnóstico e tratamento que seja diferente do uso de medicamentos alopáticos e de práticas cirúrgicas para tratar uma doença ou lesão. Ela inclui grande quantidade de terapias como a homeopatia, naturopatia, massagens, meditação, nutrição, suplementos alimentares, acupuntura, entre outras (BODANE & BROWNSON¹¹, 2002).

O médico saxão Samuel Hahnemann (1755-1843) foi o fundador único de uma nova doutrina médica, a Homeopatia, na transição dos séculos XVIII e XIX, período de revolução de idéias médicas em toda a Europa. Deixou numerosos escritos que determinaram a teoria e a prática homeopáticas, muitas das quais continuam atualmente em vigor (CORNILLOT²³, 2005).

Em 1966, durante o governo do presidente Castello Branco, foi decretada obrigatória a inclusão da Farmacologia Homeopática em todas as faculdades de farmácia do Brasil. Em 1977, foi publicada a primeira edição oficial da Farmacopéia Homeopática Brasileira. Em 1980, o Conselho Federal de Medicina reconheceu oficialmente a homeopatia como especialidade médica, deixando, assim, de ser uma “terapia alternativa” no Brasil (CORRÊA et al.²⁴, 1997).

A palavra homeopatia, oriunda do grego *homoios* = semelhante e *páthos* = doença ou sofrimento, designa a ciência terapêutica que é baseada em quatro fundamentos assim sintetizados: a) Lei da semelhança ou *Similia similibus curentur*; b) experimentação no homem sadio; c) dose mínima; d) remédio único (KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984).

Dito de forma explicativa, a “Lei da Semelhança” é:

“Todo produto que administrado em dose forte a um homem em boa saúde deflagra perturbações determinadas pode,

em dose fraca, fazer desaparecer essas mesmas perturbações no homem doente” (TETAU¹⁰⁴, 1987).

A prática da homeopatia supõe então uma experimentação realizada pela administração de várias substâncias ao homem sadio. Nesse sentido se pode dizer que a homeopatia era um método experimental. O conjunto de indícios anotados nessa experimentação feita em dose subtóxica traz o nome de patogenesia e figura nas obras da “Matéria Médica”. Essa prática também faz o emprego de doses fracas, infinitesimal, elevando-se, muitas vezes, bem além do número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), a partir de 15CH (TETAU¹⁰⁴, 1987).

Enquanto na terapêutica clássica são considerados os efeitos primários, químicos ou cumulativos dos medicamentos, estando bem estabelecida a dose útil de cada um deles, o mesmo não ocorre com a homeopatia, onde o efeito do remédio se traduz pela reação vital, variável de indivíduo a outro (KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984).

Tem um outro aspecto em relação ao medicamento homeopático que o distingue da alopatia que é a dinamização do medicamento. A dinamização é a liberação da energia dinâmica por meio da vibração molecular, as succussões. Além do medicamento homeopático ser extremamente diluído, ele passa por succussões através de agitações. Cada vez que o medicamento é diluído e passado para uma potência mais alta ele é agitado cem vezes. Essa agitação, que à primeira vista parece não ter importância, na verdade é necessária, porque muitos medicamentos simplesmente diluídos são inertes, nada fazem e, depois de agitados passam a ter um poder medicamentoso extraordinário. Isso dinamiza o medicamento, desperta nele uma energia. O medicamento homeopático age principalmente por energia, não por peso, não por massa (NOÇÕES⁷⁵, 1980).

Teorias sobre os medicamentos homeopáticos, chamados de medicamentos energéticos, estão sendo atualmente exploradas.

Instrumentos agora são capazes de medir o campo eletromagnético do corpo. Um remédio homeopático pode ter uma frequência ressonante que é capaz de interagir com uma frequência produzida pelos tecidos do corpo e assim causar um estado de equilíbrio que foi perturbado durante a doença. Pode ser possível aumentar a intensidade do campo eletromagnético de uma substância por meio de potencialização (BOYD¹⁴, 1993).

Os mecanismos de ação da homeopatia envolvem a biofísica e tem-se utilizado estudos de absorção de ultravioleta, técnicas de difração de raios X e ressonância magnética para se achar a explicação para a inversão do efeito segundo a diluição (PATRÍCIO⁷⁸, 2003). Um estudo usando ressonância magnética nuclear mostrou que 23 medicamentos e potências homeopáticas tinham nítidas leituras de atividade subatômica, o que não acontece com um placebo (ULLMAN¹¹², 1988).

Sharma⁹⁴ *apud* Ullman¹¹² (1988), professor de biofísica na Índia, teoriza que as pequenas doses usadas em homeopatia são capazes de atravessar a barreira sangüínea do cérebro e as membranas celular e nuclear. Sua hipótese é a de que os medicamentos homeopáticos mais potencializados podem atuar por mais tempo e com mais profundidade que os medicamentos menos potencializados, porque são capazes de penetrar nessas barreiras fisiológicas e, conseqüentemente, liberar seus efeitos terapêuticos com maior profundidade.

A atividade do medicamento é proporcional à sua homeopaticidade (ou semelhança com os sintomas do doente) e ao seu grau de dinamização ou potencialização que, quanto maior, maior é a atividade medicamentosa. Portanto, a atividade do medicamento é proporcional a estas duas observações e não à sua quantidade (NASSIF⁷¹, 1995).

A simplicidade dos meios terapêuticos é outra grande

característica da doutrina homeopática. A concepção holística do ser humano em seu estado fisiopatológico resulta em uma imagem dada pelos sintomas característicos. A esta imagem única só pode corresponder uma imagem medicamentosa também única (CORNILLOT²³, 2005).

O medicamento homeopático provém, basicamente, dos três reinos da natureza – vegetal, animal e mineral – bem como da indústria químico-farmacêutica (vacinas, toxinas, sintéticos) e de laboratórios biopatológicos (NASSIF⁷¹, 1995).

Todo ser vivo é composto de substâncias orgânicas e inorgânicas (sais minerais). A matéria inorgânica é fundamental para manutenção da integridade estrutural e da atividade funcional dos órgãos e tecidos. De acordo com a teoria de Schuessler, “o método bioquímico substitui os esforços curativos da natureza pelas substâncias que fazem falta nas partes afetadas, ou seja, pelos sais inorgânicos” (NOÇÕES⁷⁵, 1980). Segundo ele, a substância química predominante no tecido alterado pela doença tem ciclo biológico viciado, passível de ser restabelecido pela administração de doses reduzidas da mesma substância (KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984).

Os medicamentos bioquímicos são empregados em baixa potência (NOÇÕES⁷⁵, 1980), como a 6CH – dinamizado até a sexta potência, na escala centesimal, pelo método hahnemanniano (NASSIF⁷¹, 1995), ou em trituração e têm patogenesia sob o ponto de vista homeopático, isto é, foram experimentados no homem são (NOÇÕES⁷⁵, 1980). A administração em doses reduzidas, mas não infinitesimais, não visa a alteração das células normais, porém, são suficientes para compensar os menores desvios funcionais (KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984).

Esses medicamentos teciduais, os sais de Schussler, são: *Calcium carbonicum*, *Calcium fluoricum*, *Calcium phosphoricum*, *Calcium sulphuricum*, *Kallium muriaticum*, *Kalium phosphoricum*, *Kalium*

sulphuricum, *Ferrum phosphoricum*, *Natrium muriaticum*, *Natrium sulphuricum* e *Silicea* (NOÇÕES⁷⁵, 1980).

Calcarea fluorica ou *Calcium fluoricum*, CaF_2 , ou fluoreto de cálcio, sal de cor branca-acinzentada quando reduzido ao pó, pouco solúvel na água, dispõe de minuciosa patogenesia e se destaca pela coincidência da sua totalidade sintomática com alguns aspectos do comprometimento da hipófise, semelhantes a hipo- ou disfunção hipofisária. Hipófise e *Calcarea fluorica* influenciam a tonicidade dos ligamentos e das articulações. O indivíduo relacionado ao quadro de *Calcarea fluorica* apresenta sinais evidentes de hipertireoidismo (KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984).

É indicado fundamentalmente em doenças das fibras elásticas e do tecido ósseo, principalmente periosteal, como medicamento tecidual. Nas deformações ósseas e exostoses em diversas localizações como: crânio, mandíbula, omoplata, dedos, patela, tíbia e membros em geral, às vezes após a ocorrência de um traumatismo, ele é provavelmente o melhor medicamento. Também tem sido útil em casos de gota com deposição de cristais de monourato de sódio nas articulações (KENT⁴⁸, 1989; VIJNOVSKY¹¹³, 1992).

O tratamento homeopático curativo e, principalmente, preventivo da osteoporose oferece uma alternativa interessante aos tratamentos clássicos toda vez que estes forem contra-indicados ou, mesmo, como primeira intenção. Segundo Cornillot²³ (2005) o tratamento homeopático da osteoporose comporta todos os “calcários” da Matéria Médica, ou seja, 34 medicamentos, mas três realmente são utilizados nesta indicação que são os medicamentos constitucionais: *Calcarea carbonica*, *Calcarea phosphorica* e *Calcarea fluorica*. Entre os principais medicamentos de tropismo ósseo está a *Calcarea fluorica*, com importante ação no metabolismo ósseo. Com efeito, a intoxicação crônica fluorada pode acarretar distúrbios de osteocondensação e também distúrbios de hipocondensação muito próximos da osteomalácia, a qual

também é próxima da osteoporose. Este autor recomenda prescrição diária em 5CH ou, em caso de sujeito distrófico em 15CH, durante seis meses até um ano, e posteriormente, em tratamento de dez dias por mês, durante três anos.

Palermo et al.⁷⁶ (1999) estudaram os efeitos do medicamento homeopático *FMS Calciumfluor* prescrito especificamente para tratar osteoporose e que envolvia uma preparação de ressonância simultânea de *Calcarea fluorica* (CaF₂), *Silicea* (SiO₂) e *Magnesia phosphorica* (MgHPO₄), nas potências D6/D12 em culturas de osteoblastos derivados da tíbia de ratos. O objetivo foi de verificar diferenças nas células osteogênicas em relação à proliferação e/ou diferenciação através da modulação da expressão e produção de marcadores osteogênicos como a fosfatase alcalina (AP), indicador da maturação de osteoblastos, além da mineralização do osteóide, através da incorporação de cálcio à matriz e formação de nódulos, eventos da última fase de osteogênese. O tratamento não afetou a proliferação celular ou a expressão de metaloproteinases 2 e 9, envolvidas na remodelação da matriz extracelular. A atividade e os níveis de AP se mostraram aumentados e a incorporação de Ca à matriz aumentou, com a formação de nódulos de mineralização precocemente e em maior número quando comparado com as culturas não-tratadas. Esses efeitos foram obtidos com doses muito menores (0,043-0,086 µM) do que as concentrações de fluoretos (NaF) necessárias (10 -100 µM) (MANDUCA et al.⁶², 2005).

Os fluoretos são conhecidos agentes anabólicos para osso, atuando na proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos e células mais maduras, mas possuem estreita janela terapêutica e efeitos adversos em altas doses terapêuticas, impedindo sua aplicação no tratamento de perdas ósseas como ocorre na osteoporose. Acrescenta-se que a qualidade óssea obtida após longo tratamento com os fluoretos é muito baixa devido ao excessivo acúmulo de flúor na matriz óssea

(MANDUCA et al.⁶², 2005).

Um estudo radiográfico da densidade óptica avaliando o reparo de lesões confeccionadas em tíbias de ratos SHR castrados e medicados com risedronato, *Calcareo fluorica* e *Calcareo phosphorica*, avaliados sete e 21 dias após a confecção das lesões, mostrou valores sempre maiores nos animais tratados com risedronato, seguido dos tratados com *Calcareo phosphorica*, mas sem diferença estatisticamente significativa deste último para aqueles que receberam *Calcareo fluorica* (SENRA et al.⁹³, 2004).

Para o *National Center for Complementary and Alternative Medicine* (NCCAM⁷², 2006), várias explicações têm sido propostas sobre como a homeopatia funciona, porém nenhuma teoria foi cientificamente comprovada. Estudos usando homeopatia têm sido contraditórios em seus achados, mas mesmo os resultados positivos não são explicados cientificamente. Esse centro ainda ressalta que as controvérsias e debates que ocorrem sobre a homeopatia são causados principalmente pelo grande número de conceitos-chave que não seguem as leis da ciência, particularmente a química e a física. As falhas científicas na comprovação de tratamentos não são exclusivas da homeopatia. Existem opiniões de que a homeopatia funciona e é segura, mas que métodos científicos modernos não explicaram ainda porque funciona.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo avaliar e comparar os efeitos do risedronato e da *Calcareia fluorica* na reparação óssea em defeitos realizados em tíbias de ratas ovariectomizadas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais e grupos experimentais

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 140 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, *Wistar*) com 105 dias de idade e peso aproximado de 300g, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente e alimentadas com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob protocolo nº 025/2003-PA/CEP (Anexo A).

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- a) Grupo O - ratas ovariectomizadas e tratadas com placebo (água filtrada), via oral, duas gotas/animal/dia;
- b) Grupo S - ratas *Sham* (falso ovariectomizadas) e tratadas com placebo (água filtrada), via oral, duas gotas/animal/dia;
- c) Grupo R - ratas ovariectomizadas e tratadas com risedronato (Actonel - Hoeschst), via oral, 1,5mg/kg/dia em suspensão aquosa calculada para que a dose por animal correspondesse a três gotas;

d) Grupo Cf - ratas ovariectomizadas e tratadas com *Calcarea fluorica* 6CH (Pharmaciantiga – São José dos Campos, SP), via oral, três gotas/animal/dia em solução hidroalcoólica de preparação homeopática.

4.2 Método

4.2.1 Anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais receberam anestesia geral com solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompun - Bayer, São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, associada a ketamina base (Dopalen - Agribrands do Brasil Ltda), anestésico geral, na proporção de 1:0,5ml e administrados por via intramuscular na dose de 0,1ml/100g de peso dos animais.

4.2.2 Procedimentos cirúrgicos

4.2.2.1 Ovariectomia e falsa ovariectomia (*Sham*)

Nos animais dos grupos ovariectomizados, após a anestesia geral, foi realizada depilação da região lateral do corpo, próxima à altura dos rins e logo abaixo da última costela (Figura 2) seguida de antissepsia com álcool iodado. Uma incisão longitudinal com extensão

média de 1cm na pele e na camada muscular foi confeccionada com o uso de lâmina de bisturi nº15 montada em cabo de bisturi BardParker. O ovário foi identificado e exposto, com o auxílio de uma pinça, para fora da cavidade abdominal e, após amarra da vasculatura local, com linha de algodão, para haver contenção da hemorragia, fez-se a excisão dos ovários e de parte do útero e tecidos moles adjacentes (Figura 3). As trompas foram reposicionadas na cavidade abdominal e, em seguida, a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda 3.0 (Ethicon - Johnson & Johnson). Nova anti-sepsia foi realizada na região com álcool iodado. Estes procedimentos foram realizados bilateralmente.

Nos animais do grupo falso ovariectomizado, ou grupo *Sham* todos os procedimentos acima foram realizados, incluindo a exposição dos ovários, exceto a amarra da vasculatura e a remoção dos mesmos.



FIGURA 2 - Rata após a realização da depilação da região a ser operada para a realização da OVX.

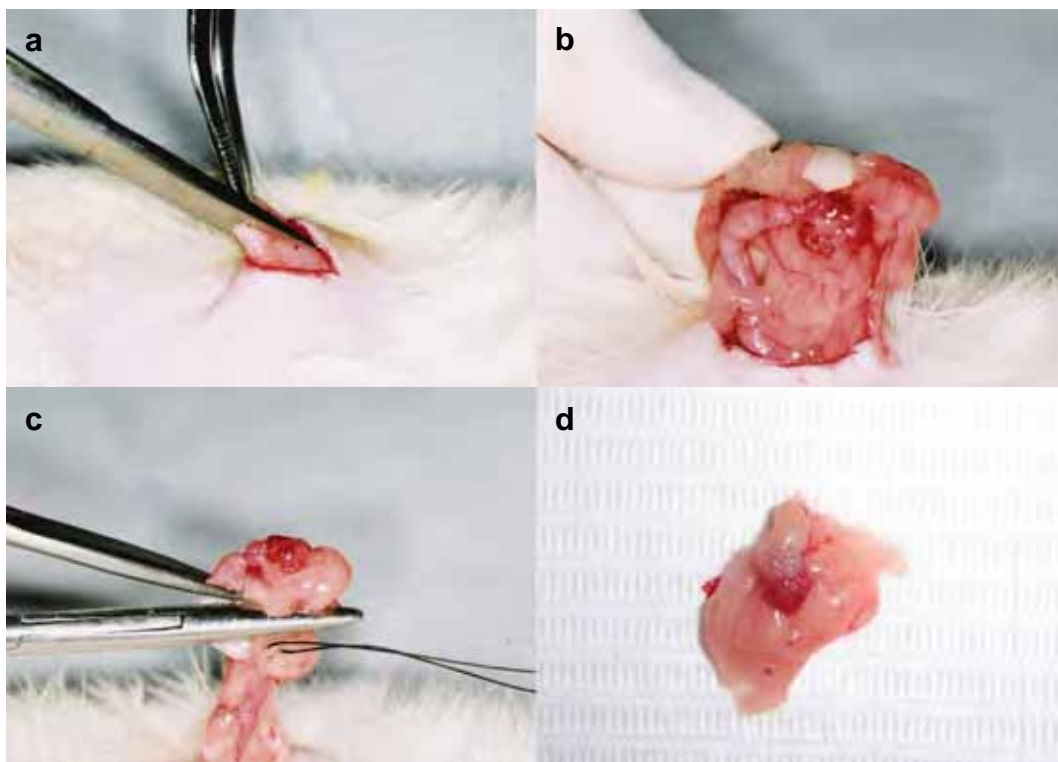


FIGURA 3 – Ovariectomia: a) corte da camada muscular; b) exposição dos ovários e útero; c) amarra e excisão dos ovários; d) parte do útero e tecido retirado.

4.2.2.2 Execução da lesão óssea

Em todos os animais foi realizado um defeito ósseo monocortical, arredondado, até o limite da medula óssea, na tíbia direita, após 35 dias de castração. Após serem novamente anestesiados, realizou-se depilação da região (Figura 4) e, após antisepsia local com álcool iodado, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5cm na pele e músculo, na região do terço proximal tibiano, face medial, com o uso de lâmina de bisturi nº15 montada em cabo de bisturi BardParker (Figura 5). Após a exposição da tíbia do animal, o perióstio e os tecidos moles foram afastados com espátula nº7 e até a exposição do tecido ósseo. O defeito monocortical, realizado na face medial do osso, com a utilização de uma broca esférica carbide de 2,5 mm de diâmetro (nº8) utilizando-se motor elétrico (Asséptico – AEV 707 *Implant Surgery System*), na velocidade de 1500 rpm, sob irrigação constante e abundante com solução de NaCl 0,9% estéril durante toda a manipulação. Após preenchimento do defeito ósseo com coágulo sanguíneo e estabilização do mesmo a região foi suturada por planos com fio de seda 3.0 (Ethicon - Johnson & Johnson). Nova anti-sepsia foi realizada na região com álcool iodado.



FIGURA 4 - Rata após a realização da depilação da região a ser operada para a realização do defeito ósseo.

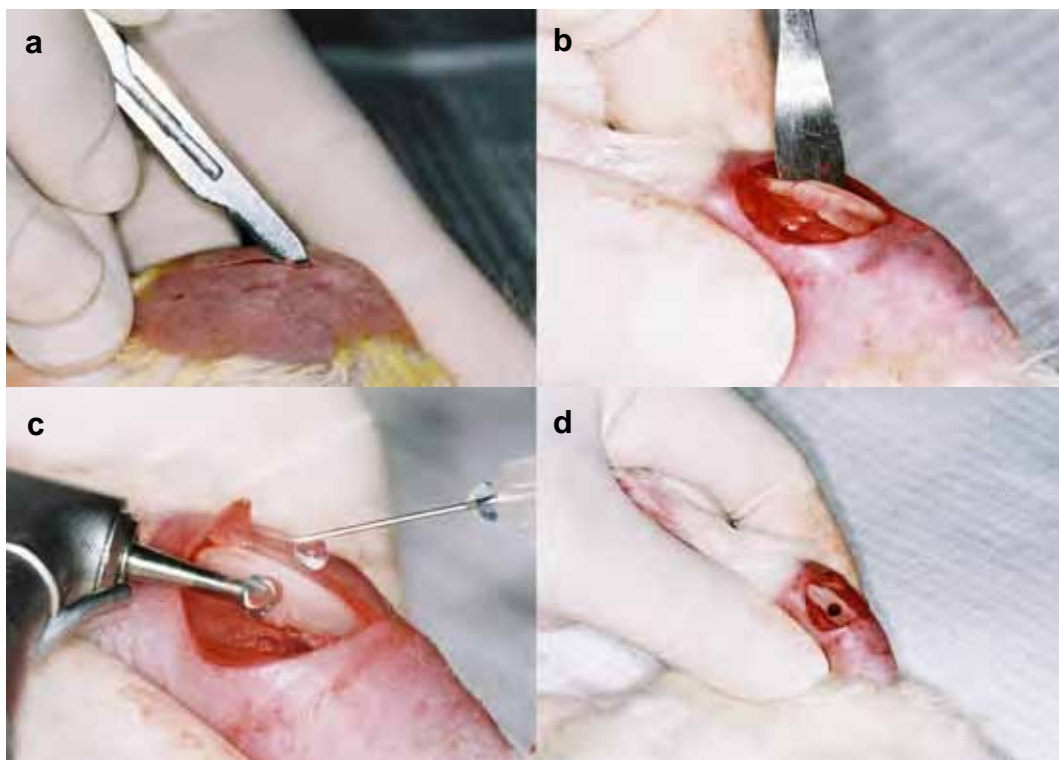


FIGURA 5 - Execução do defeito ósseo: a) incisão; b) afastamento da musculatura; c) perfuração com broca e irrigação; d) defeito criado.

4.2.3 Tratamento

No dia seguinte à realização da lesão, os animais iniciaram o tratamento, via oral, com auxílio de apreensão manual, através de conta-gotas, ficando então os grupos divididos conforme a Figura 6.

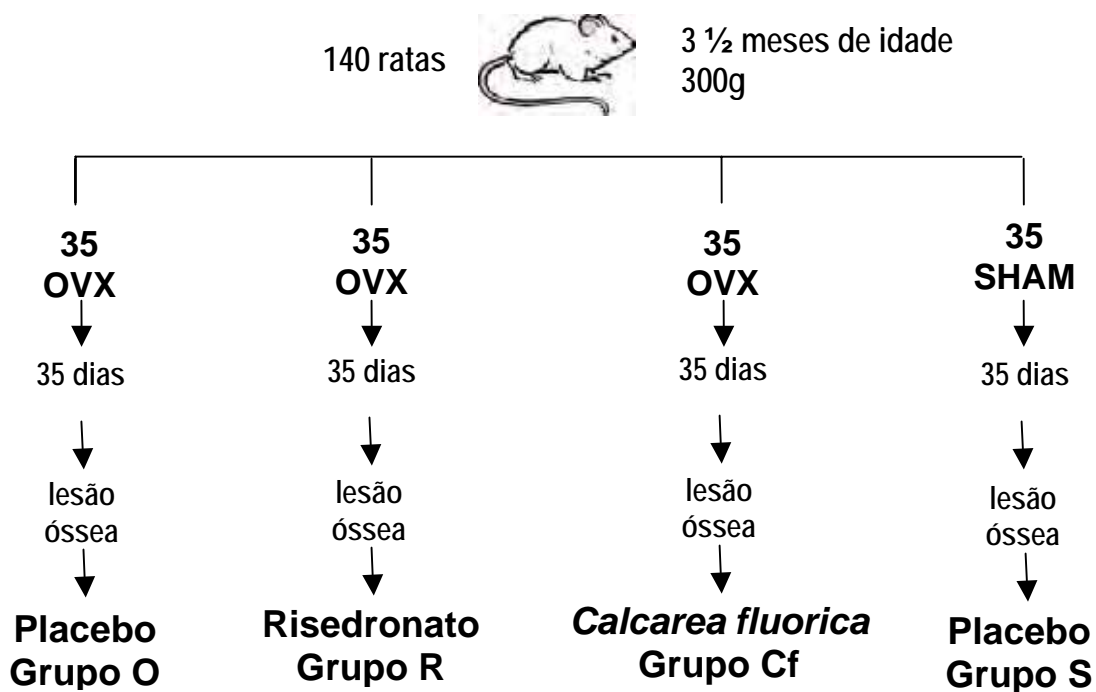


FIGURA 6 - Divisão dos grupos experimentais para a realização do tratamento.

4.2.4 Sacrifício e tempos experimentais

Todas as ratas foram sacrificadas, em grupos de sete animais, após três, seis, 12, 18 e 24 dias a partir do início do tratamento. Para a realização do sacrifício foi utilizada anestesia geral em dose excessiva. Em seguida as tíbias foram retiradas, parcialmente descarnadas e fixadas com solução de formol a 10% (Formaldeído - Regentes Analíticos Dinâmica), durante o período mínimo de 48 horas.

4.2.5 Análise do reparo ósseo

O reparo ósseo na região do defeito monocortical na tibia foi recebido avaliações radiográfica, histológica e histomorfométrica.

4.2.5.1 Análise radiográfica

As tíbias foram radiografadas pelo Sistema de Radiografia Digital Direta Intrabucal RVGui, versão 5.0 (*Trophy Radiology, Marnela-Vallée, France*) dotado de dispositivo de carga acoplada, o sensor CCD (*charged-coupled device*) para captura direta de imagem constituído de um sistema ligado por cabo ao microcomputador, e utilizando aparelho radiográfico com corrente contínua Gendex 765DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA*) de 65kVp e 7mA com filtração de 2mm/Al, ponto focal efetivo de 0,4mm² e área focal de 6cm. Para isso as tíbias foram posicionadas sobre o sensor, que estava fixado em uma mesa, com a face na qual se encontrava a lesão óssea

centralizada na área ativa, que é de 30x20mm, e voltada para o sensor de forma a não ser observada sobreposição das corticais na imagem radiográfica da lesão. As tomadas radiográficas, com tempo de exposição de 0,125s e com o cilindro posicionado com distância focal de 40cm foram realizadas pela técnica do paralelismo (Figura 7).

O sensor do sistema de radiografia digital direta intrabucal RVGui proporciona três tipos de imagens e dois modos de resolução espacial. O modo de alta resolução, que foi utilizado nesta pesquisa, produz imagens grandes de 1840x1360 *pixels* e este foi associado ao tipo de imagem do modo “perio”, que é utilizado para observação do osso alveolar. As imagens radiográficas foram obtidas com resolução de 600 dpi, salvas em formato *bitmap* (bmp) e analisadas pelo programa UTHSCSA *Image Tool*, versão 3.00 (*University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, Texas, USA*) quanto à densidade óptica (DO). A densidade óptica foi medida em uma região selecionada por uma elipse que delimitava toda área do defeito criado e era demonstrada pelo programa em uma escala de 256 níveis de cinza onde o preto correspondia ao zero e o branco ao 255.



FIGURA 7 - Sistema de radiografias digitais RVGui (Trophy) e monitor do computador mostrando a imagem radiográfica digital capturada. Em detalhe, sensor CCD com a tíbia montada na posição utilizada para radiografar.

4.2.5.2 Análise histológica

Após a realização da tomada radiográfica das peças, as tíbias foram aparadas e submetidas à descalcificação com solução de Plank-Rychlo. A solução estoque foi preparada da seguinte forma: cloreto de alumínio 126,10gramas + ácido clorídrico 10N, 85ml + ácido fórmico 88%, 54ml dissolvidos em 1 litro de água destilada. Na hora da utilização esta solução foi diluída em água destilada na proporção de 1:4. Após a descalcificação completa, as tíbias foram seccionadas transversalmente adjacente ao limite distal do defeito ósseo. O fragmento contendo a lesão foi incluído, no sentido da superfície de corte, em bloco de parafina e submetido a processamento histológico de rotina com obtenção de cortes

semi-seriados com aproximadamente 5 a 6µm de espessura e aprofundamento de 100µm em cada nível, somando um total de doze lâminas em cada bloco. Para cada nível foram confeccionadas duas lâminas, uma foi corada com Hematoxilina e Eosina (HE – *Merck & Co., Inc.*) e a outra com Tricrômio de Masson (*SIGMA Diagnostics – St. Louis, MO, USA*).

Após, os cortes mais centrais do defeito foram selecionados e submetidos à análise, com o auxílio de microscopia de luz, avaliando-se os aspectos morfológicos da reparação óssea, analisando o desenvolvimento, substituição, maturação e remodelação das diversas estruturas que se formam nas fases seqüenciais do reparo ósseo: coágulo sangüíneo, tecido de granulação, aparecimento de células osteogênicas, trabéculas ósseas neoformadas (matriz osteóide e matriz mineralizada), trabéculas ósseas maduras e remodelação das mesmas.

4.2.5.3 Análise histomorfométrica

Para a documentação e análise histomorfométrica, as lâminas foram fotografadas em diferentes aumentos com microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com câmera digital acoplada Cyber-shot Sony, modelo DSC-S85. As imagens digitais (formato JPEG) em aumento de 25x, de quatro lâminas, para cada animal, da região mais central do defeito e coradas por Tricrômico de Masson foram selecionadas para análise quantitativa do tecido ósseo neoformado

Utilizou-se o programa NIH *Image J* (*U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA* - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), versão 1.31 para *Windows*. Foi calculada a área em *pixels*² de uma região delimitada que abrangia todo o defeito criado e o canal medular adjacente, chamada de área A, e também calculada uma segunda área

formada pela delimitação de toda a área preenchida por osso, chamada de área B (Figura 9). Usando os valores obtidos calculou-se a proporção de área preenchida por osso em relação à área A no corte analisado seguindo a equação:

$$\text{Preenchimento (\%)} = \frac{\text{Área B}}{\text{Área A}} \times 100$$

FIGURA 8 - Fórmula para realização do cálculo do percentual de preenchimento do defeito e canal medular.

A seguir, utilizou-se a ferramenta *magic wand* do programa *Adobe Photoshop*, versão 7.0, para selecionar somente as trabéculas ósseas presentes na área B, após delimitação prévia da área de preenchimento com a ferramenta *eraser*. Essas trabéculas marcadas foram copiadas e salvas como uma nova imagem (Figura 11) que foi analisada pelo programa *Image J* para cálculo da área dessas trabéculas através dos seguintes passos:

- a) conversão da imagem para escala de cinza: *Image* → *Type* → *8-bit*;
- b) conversão da imagem para preto e branco: *Process* → *Binary* → *Threshold*;
- c) medição da área: *Analyze* → *Analyze Particles* (coloque *500* para *minimum particle size*, escolha *Summarize* e clique em 'OK');

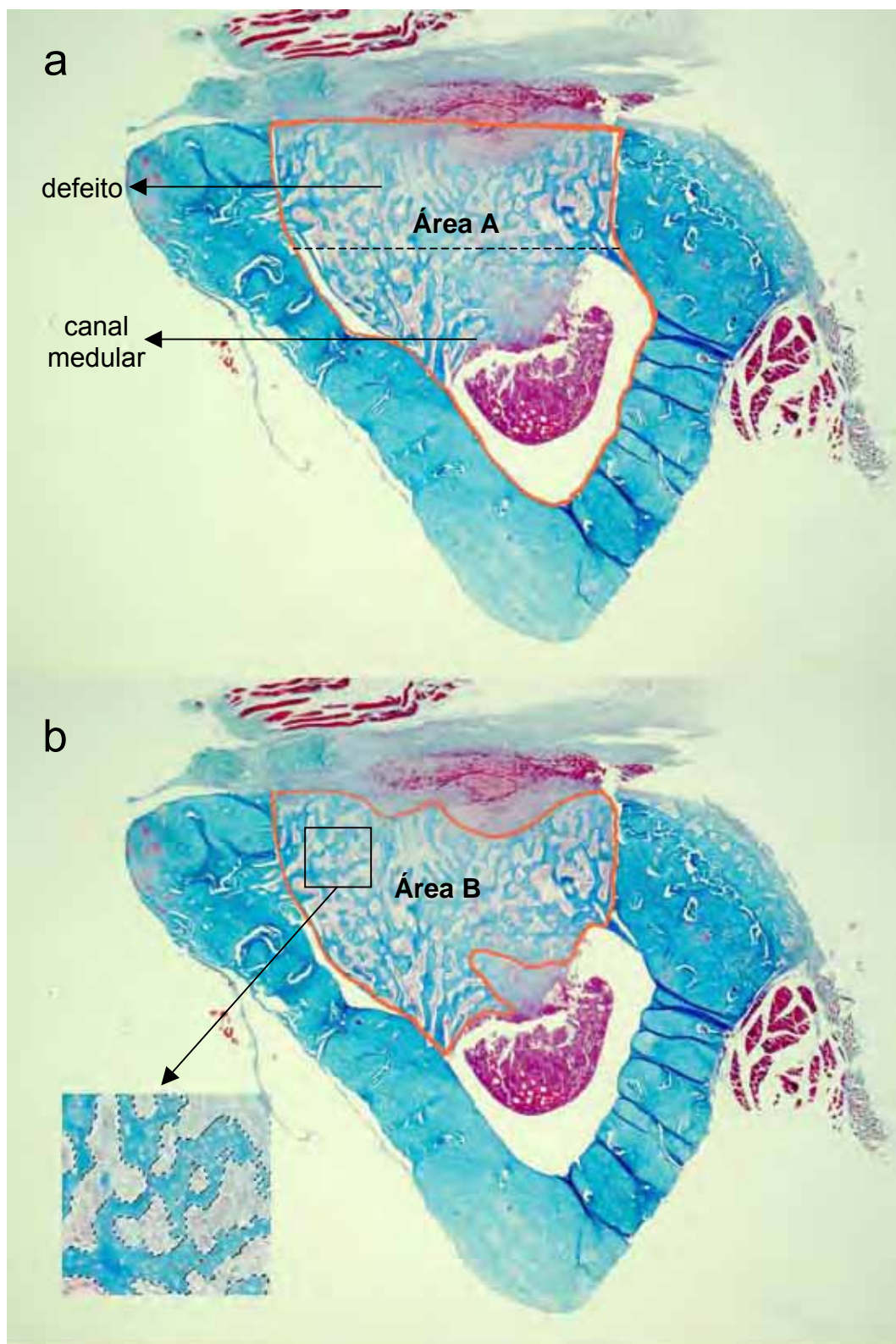


FIGURA 9 - Delimitações das áreas A e B: a) área A (soma da área do defeito e do canal medular); b) área B e demarcação dos limites das trabéculas (pontilhado) em detalhe.

Com esses passos a área analisada (trabéculas) foi delimitada e medida automaticamente em *pixels*². A proporção de osso formado (área trabecular) foi então calculada através da relação entre a área ocupada somente pelas trabéculas ósseas neoformadas (área C) (Figura 11) e a área preenchida por osso (área B) segundo a equação:

$$\text{Área trabecular (\%)} = \frac{\text{Área C}}{\text{Área B}} \times 100$$

FIGURA 10 - Fórmula para realização do cálculo do percentual de área trabecular dentro da área de preenchimento.

Esse cálculo permite o conhecimento da proporção entre trabéculas ósseas e espaço intertrabecular.

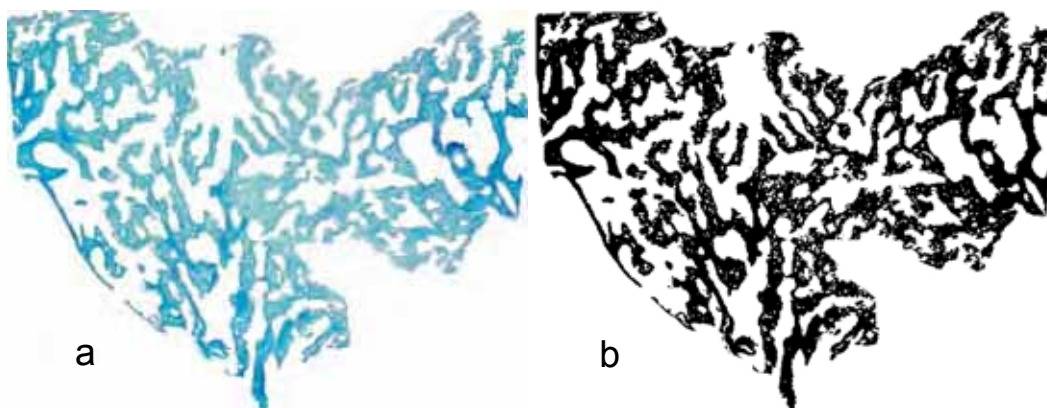


FIGURA 11 - Imagem: a) somente das trabéculas ósseas obtidas pelo Adobe *Photoshop*; b) após o *Threshold* do *Image J* representando a área C (em negro) que é considerada para o cálculo da área trabecular.

As imagens possuíam código que não permitia a identificação do grupo experimental ao qual pertenciam, possibilitando uma análise cega dos dados, que foram tabulados e submetidos à análise

estatística. O valor da porcentagem de área preenchida por osso e a porcentagem de volume trabecular nessa área, por animal, corresponderam à média dos valores obtidos nas quatro lâminas analisadas.

4.2.6 Análise estatística

A reparação foi medida operacionalmente de três formas:

- a) densidade óptica da região do defeito criado (n=7);
- b) proporção de área preenchida por osso (n=6);
- c) proporção de área trabecular (n=6).

Os dados obtidos por meio da análise da densidade óptica (0 a 255 da escala de cinza) e da análise histomorfométrica (%) foram analisados de forma descritiva (média e desvio-padrão) e inferencial. Para a análise estatística foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA, fator duplo) e o teste de Comparação Múltipla de Tukey, com nível de significância de 5% através da utilização dos programas *STATISTICA for Windows*, versão 7.0 (2000 - *Analytical Software Co.*) e *Excel 2003 for Windows*.

A análise estatística foi realizada em duas partes. A primeira seguiu um esquema fatorial tipo 2x5, para a densidade óptica, e 2x4 para as análises histomorfométricas, sendo que as variáveis independentes consideradas foram a presença (*Sham*) ou ausência de ovários (OVX) e os tempos de sacrifício dos animais (três, seis, 12, 18 e 24 dias, para a densidade óptica, e seis, 12, 18 e 24 dias, para a histomorfometria). A segunda parte da análise estatística seguiu um esquema fatorial tipo 4x5, para a densidade óptica, e 4x4 para as análises histomorfométricas, sendo que as variáveis independentes consideradas foram os tipos de tratamento - *Sham* e placebo (S), OVX e placebo (O),

OVX e *Calcareia fluorica* (Cf), além de OVX e risedronato (R) e os tempos de sacrifício dos animais (três, seis, 12, 18 e 24 dias, para a densidade óptica, e seis, 12, 18 e 24 dias, para a histomorfometria)

A variável resposta (ou dependente) foi a reparação óssea das tíbias dos animais em cada uma das condições experimentais.

5 RESULTADO

Neste capítulo foram analisados os dados da reparação óssea obtidos por meio de análise histológica morfométrica e descritiva e da análise da densidade óptica.

Para as análises quantitativas, os dados obtidos foram divididos e analisados em duas partes. Na primeira foram analisados os grupos que receberam placebo, os grupos O e S, enquanto que na segunda comparou-se os dados dos animais dos grupos ovariectomizados entre si (R, Cf e O).

5.1 Densidade óptica

5.1.1 Análise estatística dos grupos O e S

Os dados referentes à análise descritiva das médias de densidade óptica estão apresentados na Tabela 1 e representados na Figura 12, mostrados a seguir.

Tabela 1– Média e desvio-padrão dos dados de densidade óptica segundo as variáveis: ovariectomia (presença ou ausência de ovários) e tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	n	Ovariectomia (m±dp)	
		O	S
3	7	95,36 ±7,12	80,71 ±5,88
6	7	98,00 ±8,88	96,79 ±9,78
12	7	104,57 ±8,93	102,00 ±4,41
18	7	97,00 ±9,04	101,21 ±7,42
24	7	92,21 ±7,29	101,43 ±9,34

n = tamanho da amostra

O = Ovariectomizado + placebo

S = *Sham* + placebo

m±dp = média ± desvio-padrão

Observou-se que os valores médios do grupo O foram superiores aos do grupo S nos períodos de três, seis e 12 dias. Já nos períodos de 18 e 24 dias o grupo S mostrou valores superiores ao grupo O (Tabela 1).

Os valores de densidade óptica no grupo O se mostraram crescentes com o aumento do tempo de reparo até os 12 dias, quando sofreram uma queda. Já para o grupo S houve crescimento dos valores até os 12 dias, mas após isso, mostraram tendência à estabilização.

A análise de variância (ANOVA) referente a esses dados encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da ANOVA para aos dados de densidade óptica

Fonte de Variação	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	4	1742,57	435,64	6,84	0,0001*
Ovariectomia	1	17,50	17,50	0,27	0,602
Interações	4	1120,57	280,14	4,40	0,0034*
Resíduos	60	3821,50	63,69		
Total	69	6702,14			

*p<0,05

Os resultados (Tabela 2) revelaram como efeito significativo o fator tempo e a sua interação com o fator ovariectomia.

Quando realizado o teste de Tukey (5%) (Tabela 3 e Figura 12) verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores dos diferentes períodos do grupo O, enquanto que o grupo S mostrou, no período de três dias, média significativamente diferente das médias dos outros dias do grupo.

Após a comparação entre os grupos O e S nos diferentes tempos de reparo, verificou-se que as médias de densidade óptica só diferiram estatisticamente no período de três dias e mostraram valores significativamente iguais em todos os outros períodos.

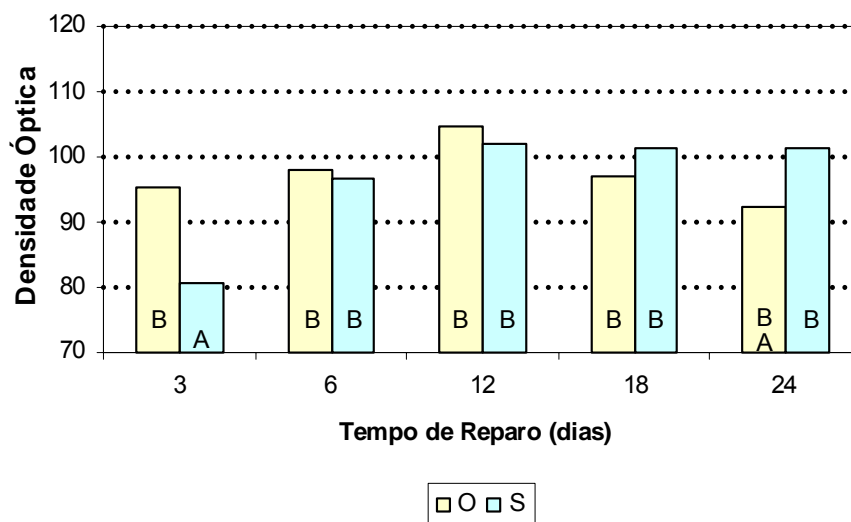


FIGURA 12 – Gráfico das médias referentes aos valores de densidade óptica considerando o efeito da ovariectomia e do tempo de reparo, mostrando grupos homogêneos (Tukey).

Tabela 3 – Representação, em ordem crescente, das médias de densidade óptica (DO) dos grupos, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Grupos	Tempo de Reparo (dias)	Média DO	Grupos Homogêneos
S	3	80,71	A
O	24	92,21	A B
O	3	95,36	B
S	6	96,79	B
O	18	97,00	B
O	6	98,00	B
S	18	101,21	B
S	24	101,43	B
S	12	102,14	B
O	12	104,57	B

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

5.1.2 Análise estatística dos grupos R, Cf e O

Para a análise dos resultados de densidade óptica dos grupos ovariectomizados com diferentes tipos de tratamento, em relação ao tempo de reparo, foi realizada a estatística descritiva, cujos valores encontram-se na Tabela 4 e representados na Figura 13.

Tabela 4 – Média e desvio-padrão dos dados de densidade óptica segundo as variáveis: tratamento e tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	n	Tratamentos (m±dp)		
		R	Cf	O
3	7	90,93 ±5,35	80,00 ±7,00	95,36 ±7,12
6	7	91,86 ±4,92	92,86 ±5,56	98,00 ±8,88
12	7	111,93 ±8,37	105,21 ±6,79	104,57 ±8,93
18	7	116,50 ±6,72	98,86 ±7,29	97,00 ±9,04
24	7	113,50 ±7,38	90,43 ±5,34	92,21 ±7,29

n = tamanho da amostra

R = Ovariectomizado + risedronato

Cf = Ovariectomizado + *Calcareo fluorica*

O = Ovariectomizado + placebo

m±dp = média ± desvio-padrão

Os grupos Cf e O mostraram médias de densidade óptica com valores crescentes até o período de 12 dias e, a partir deste período, as médias tiveram valores decrescentes. Já o grupo R mostrou valores crescentes até os 18 dias, com decréscimo de valores após este período de tempo.

Tabela 5 – Resultado da ANOVA referente aos dados de densidade óptica

Fonte de Variação	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	4	4638,96	1159,74	22,43	0,0000*
Tratamento	2	2376,70	1188,35	22,98	0,0000*
Interações	8	2810,82	351,35	6,80	0,0000*
Resíduos	90	4653,14	51,70		
Total	104	14479,63			

*p<0,05

Os dados apresentados na Tabela 5 possibilitaram rejeitar a hipótese de igualdade entre os efeitos do tratamento e tempo de reparo, mostrando interação significativa entre os fatores.

Após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) (Tabela 6), pode-se afirmar que as condições com os maiores valores foram aquelas formadas pelo grupo R aos 18 e 24 dias, sendo seguidas pelo período de 12 dias para todos os grupos.

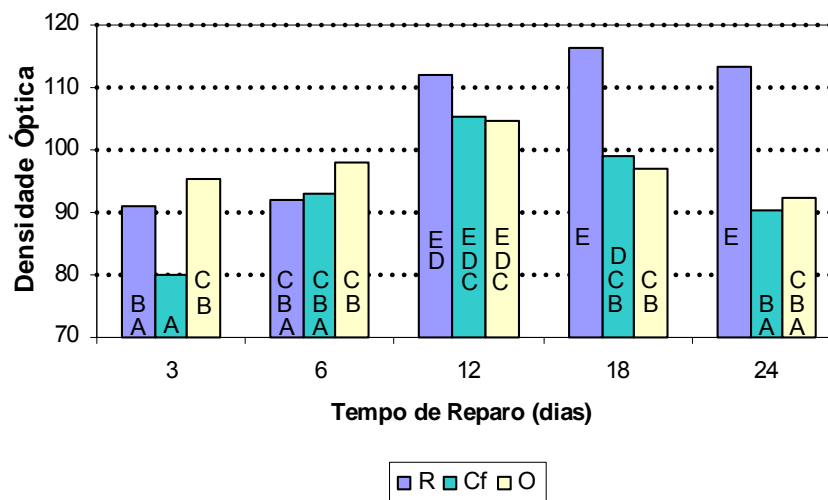


FIGURA 13 – Gráfico das médias referentes aos valores de densidade óptica considerando os tratamentos, os tempos de reparo e mostrando os grupos homogêneos (Tukey).

Tabela 6 – Representação, em ordem crescente, das médias de densidade óptica (DO) dos grupos, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Grupos	Tempo de Reparo (dias)	Média DO	Grupos Homogêneos				
Cf	3	80,00	A				
Cf	24	90,43	A	B			
R	3	90,93	A	B			
R	6	91,86	A	B	C		
O	24	92,21	A	B	C		
Cf	6	92,86	A	B	C		
O	3	95,36		B	C		
O	18	97,00		B	C		
O	6	98,00		B	C		
Cf	18	98,86		B	C	D	
O	12	104,57			C	D	E
Cf	12	105,21			C	D	E
R	12	111,93				D	E
R	24	113,50					E
R	18	116,50					E

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

Quando comparou-se os grupos dentro dos tempos de reparo foi observado que aos três dias o grupo Cf mostrou a média mais baixa de densidade sem, no entanto, diferir de forma estatisticamente significativa do grupo R. Tanto para o período de seis dias, quanto para 12 dias, não houve diferença entre os tratamentos para os valores médios de densidade óptica. Aos 18 e 24 dias o grupo R mostrou os valores mais altos, com diferença estatisticamente significativa dos outros grupos.

5.2 Análise histomorfométrica

5.2.1 Preenchimento com tecido ósseo nos grupos O e S

A estatística descritiva dos dados de preenchimento com tecido ósseo (%) na área do defeito e canal medular encontra-se na Tabela 7 e Figuras 14 e 15.

Os valores referentes ao período de três dias não se encontram representados, pois a quantidade de osso presente em alguns animais nesse período era muito pequena e imensurável pelo método utilizado neste estudo e foi considerado como zero.

Tabela 7 – Média e desvio-padrão dos dados preenchimento com tecido ósseo (% da área total) segundo as variáveis: ovariectomia (presença ou ausência de ovários) e tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	n	Ovariectomia (m±dp)	
		O	S
6	6	24,56 ±12,66	33,86 ±14,04
12	6	65,93 ±14,65	67,40 ±8,26
18	6	23,77 ±3,88	30,18 ±8,96
24	6	21,25 ±7,36	29,29 ±6,30

n = tamanho da amostra

O = Ovariectomizado + placebo

S = *Sham* + placebo

m±dp = média ± desvio-padrão

Ambos os grupos, O e S, mostraram comportamento semelhante em relação ao tempo de reparo. Seus valores médios de preenchimento cresceram até os 12 dias e, a partir de então, sofreram uma queda, sempre mostrando valores próximos entre os dois grupos.

Após a realização da análise de variância (ANOVA), representada pela Tabela 8 verificou-se ausência de interação significativa e então os fatores ovariectomia e tempo foram analisados separadamente, ambos fatores mostrando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Resultado da ANOVA para os dados de preenchimento com tecido ósseo nos grupo O e S

Fonte de Variação	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	1	0,044848	0,044848	4,1860	0,0477*
Ovariectomia	3	1,379722	0,459907	42,9259	0,0000*
Interações	3	0,010426	0,003475	0,3244	0,8077#
Resíduos	38	0,407131	0,010714		
Total	45	1,84			

* $p < 0,05$

$p > 0,05$, portanto não há interação: cada fator deve ser analisado separadamente

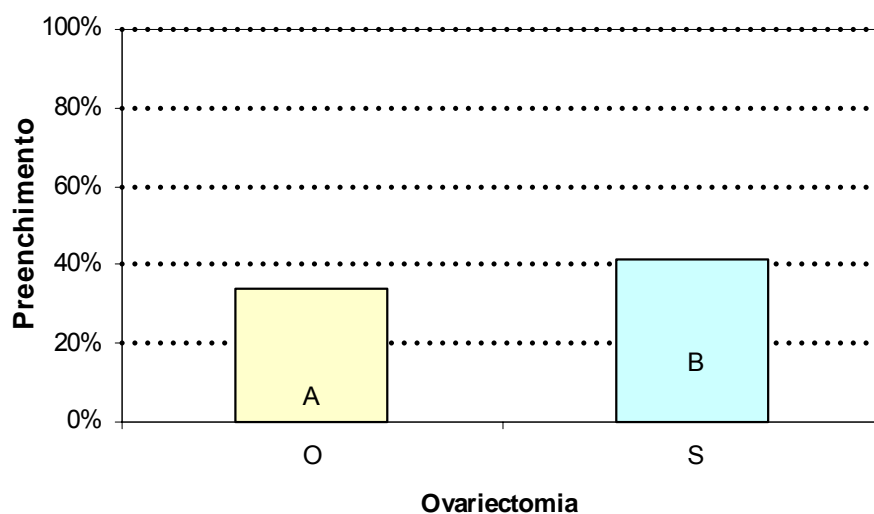


FIGURA 14 – Gráfico das médias referentes aos valores preenchimento com osso (%), considerando a ovariectomia, mostrando grupos

homogêneos.

Pode-se observar na Tabela 9 o efeito da ovariectomia, mostrando que o grupo O apresentou valores menores de preenchimento com tecido ósseo com diferença estatisticamente significativa do grupo S.

Após a realização do teste de Tukey (Tabela 10) para o fator tempo de reparo verificou-se a existência de dois grupos homogêneos, um representado pelo período de 12 dias e o outro, pelo conjunto dos outros tempos de reparo (seis, 18 e 24 dias).

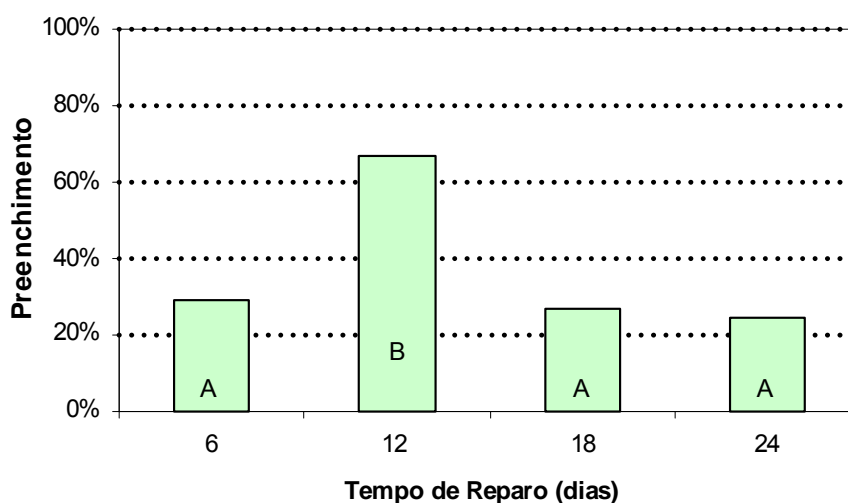


FIGURA 15 – Gráfico das médias referentes aos valores de preenchimento com osso (%), considerando o tempo de reparo, mostrando grupos homogêneos (Tukey).

Tabela 9 – Representação, em ordem crescente, das médias de preenchimento com tecido ósseo (%) dos grupos O e S, mostrando os grupos homogêneos considerando separadamente a variável ovariectomia (presença ou ausência de ovários)

Grupos	Média	Grupos Homogêneos
O	33,88	A

S	41,17	B
---	-------	---

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

Tabela 10 – Representação, em ordem crescente, das médias de preenchimento com tecido ósseo (%) dos grupos O e S, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%), realizado separadamente para a variável tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	Média	Grupos Homogêneos
24	24,47	A
18	26,97	A
6	29,21	A
12	66,67	B

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

5.2.2 Preenchimento com tecido ósseo nos grupos R, Cf e O

Os dados da estatística descritiva (média e desvio-padrão) referentes aos tratamentos e aos diferentes períodos de observação estão apresentados na Tabela 11 e representados na Figura 16.

Os valores referentes ao período de três dias não se encontram representados, pois a quantidade de osso presente em alguns animais nesse período era muito pequena e imensurável pelo método utilizado neste estudo, sendo considerados como zero.

Observou-se (Tabela 11 e Figura 16) que todos os grupos apresentam picos dos valores médios de preenchimento com osso aos 12 dias, havendo decréscimo desses valores até 24 dias, com exceção do grupo R, que sofreu uma queda aos 18 dias e elevou novamente seus valores aos 24 dias.

Tabela 11 – Média e desvio-padrão dos dados preenchimento com tecido ósseo (% da área total) segundo as variáveis tratamento e tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	n	Tratamentos (m±dp)		
		R	Cf	O
6	6	80,86 ±5,13	60,87 ±8,39	24,56 ±12,66
12	6	98,21 ±8,21	65,38 ±13,41	65,93 ±14,65
18	6	75,61 ±13,85	24,36 ±10,29	23,77 ±3,88
24	6	95,78 ±5,87	23,41 ±9,58	21,25 ±7,36

n = tamanho da amostra

R = Ovariectomizado + risedronato

Cf = Ovariectomizado + *Calcareia fluorica*

O = Ovariectomizado + placebo

m±dp = média ± desvio-padrão

Quando aplicado o teste ANOVA para as variáveis tempo de reparo e tratamento, verificou-se que o efeito conjunto dessas duas variáveis foi estatisticamente significativa, como observado na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultado da ANOVA referente aos dados de preenchimento com tecido ósseo nos grupo R, Cf e O

Fonte de Variação	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	2	3,94082	1,97041	194,955	0,0000*
Tratamento	3	1,29409	0,43136	42,680	0,0000*
Interações	6	0,68300	0,11383	11,263	0,0000*
Resíduos	60	0,60642	0,01011		
Total	71	6,52			

*p<0,05

As médias das condições experimentais estabelecidas pelas variáveis tempo e tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) (Tabela 13).

Tabela 13 – Representação, em ordem crescente, das médias de preenchimento com tecido ósseo (%) dos grupos R, Cf e O, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Grupos	Tempo de Reparo (dias)	Média	Grupos Homogêneos		
O	24	21,25	A		
Cf	24	23,41	A		
O	18	23,77	A		
Cf	18	24,36	A		
O	6	24,56	A		
Cf	6	60,87	B		
Cf	12	65,38	B	C	
O	12	65,93	B	C	
R	18	75,61	B	C	
R	6	80,86		C	D
R	24	95,78			D
R	12	98,21			D

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

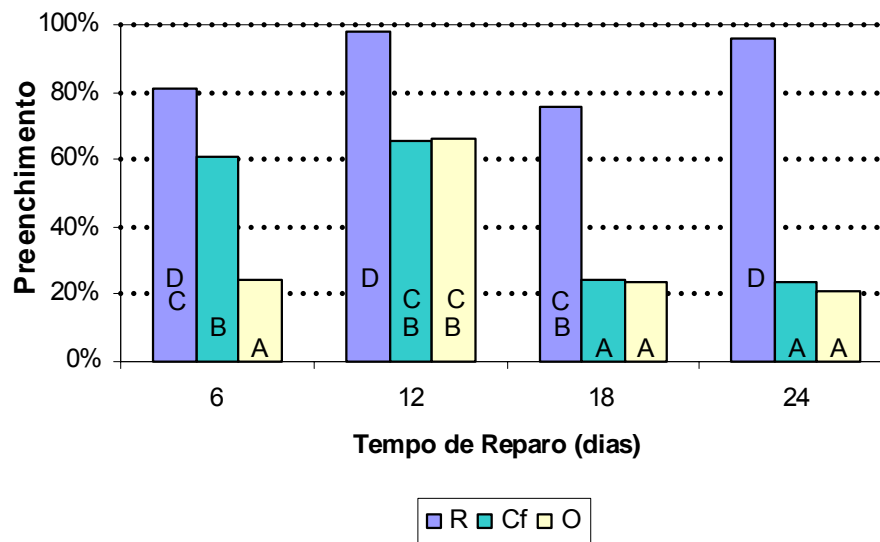


FIGURA 16 – Gráfico das médias referentes aos valores preenchimento com osso (%), considerando os tratamentos e os tempos de reparo, mostrando os grupos homogêneos (Tukey).

Em todos os períodos de observação o grupo R mostrou os maiores valores de preenchimento, diferindo estatisticamente dos outros grupos.

Os grupos Cf e O se mostraram com valores estatisticamente iguais em todos os períodos de tempo, diferindo somente aos seis dias, quando o grupo Cf se mostrou superior ao O.

5.2.3 Área de osso trabecular nos grupos O e S

Os dados da estatística descritiva (média e desvio-padrão) referentes à ovariectomia (presença ou ausência de ovários) e aos diferentes períodos de observação estão apresentados na Tabela 14 e representados nas Figuras 17 e 18.

Pôde-se observar que as médias dos valores de porcentagem de área trabecular nos grupos O e S mostraram comportamento semelhante em relação aos dias de observação através de valores em queda do sexto para o 12^o dia e aumento desses valores até o 24^o dia. Os valores maiores foram encontrados no grupo O (Tabela 14).

Tabela 14 – Média e desvio-padrão dos dados área trabecular (% do preenchimento) segundo as variáveis ovariectomia (presença ou ausência de ovários) e tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	n	Ovariectomia (m±dp)	
		O	S
6	6	50,75 ±21,05	44,79 ±5,19
12	6	43,60 ±2,45	40,15 ±8,25
18	6	61,60 ±4,67	52,98 ±8,76
24	6	75,22 ±5,18	71,53 ±8,39

n = tamanho da amostra

O = Ovariectomizado + placebo

S = *Sham* + placebo

m±dp = média ± desvio-padrão

Quando realizada a análise de variância ANOVA (Tabela 15) foi verificado que o fator ovariectomia (presença ou ausência de ovários) não foi significativa, assim como sua interação com o fator tempo. Assim, o fator tempo, foi o único a apresentar significância, sendo analisado separadamente pelo teste de Tukey (5%) (Tabela 16 e 17).

Tabela 15 – Resultado da ANOVA para os dados de área trabecular (%) nos grupo O e S

Fonte de Variação	gl	SQ	QM	F	p
Ovariectomia	1	0,03330	0,03330	3,552	0,0671
Tempo	3	0,59629	0,19876	21,201	0,0000*
Interações	3	0,00501	0,00167	0,178	0,9104#
Resíduos	38	0,35626	0,00938		
Total	45	0,99			

*p<0,05

#p>0,05, portanto não há interação: cada fator deve ser analisado separadamente

Tabela 16 – Representação, em ordem crescente, das médias de área trabecular (%) dos grupos O e S, mostrando os grupos homogêneos considerando separadamente a variável ovariectomia (presença ou ausência de ovários)

Grupos	Média	Grupos Homogêneos
O	57,80	A
S	50,62	A

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

Tabela 17 – Representação, em ordem crescente, das médias de área trabecular (%) dos grupos O e S, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%), mostrando separadamente a variável tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	Média	Grupos Homogêneos
12	41,87	A
6	47,77	A B
18	57,29	B
24	73,74	C

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

A Figura 17 mostra que as médias dos grupos O e S não diferem de forma estatisticamente significativa e fazem parte de um mesmo grupo homogêneo.

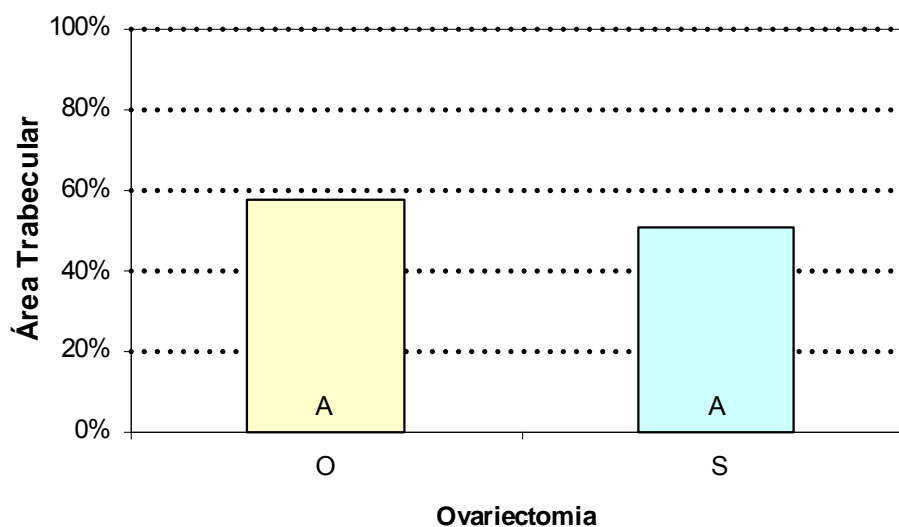


FIGURA 17 – Gráfico das médias referentes aos valores de área trabecular (%), considerando a ovariectomia, mostrando grupos homogêneos (Tukey).

Considerando o fator tempo de reparo no teste de Tukey observa-se a presença de três grupos homogêneos. O período de seis dias mostrou valores intermediários aos dos períodos de 12 e 18 dias (Figura 18).

A condição com maior área percentual ocupada por trabéculas, nos grupos O e S, foi encontrada aos 24 dias.

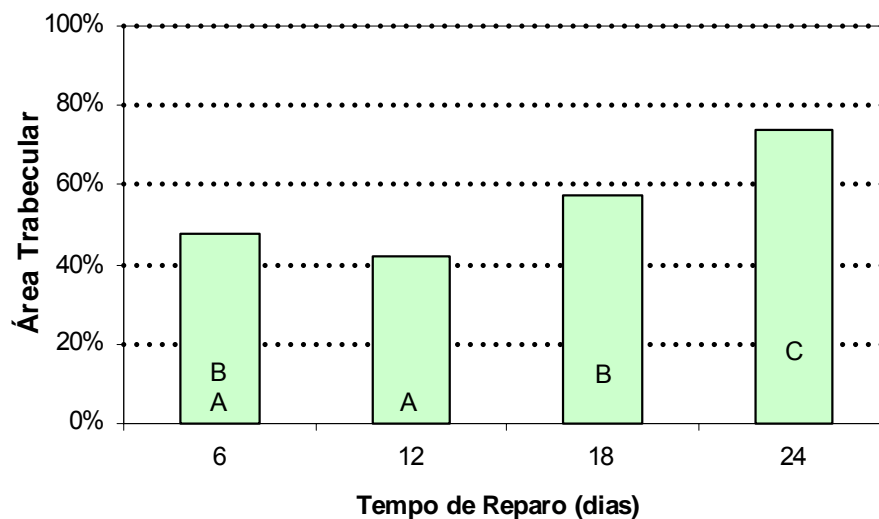


FIGURA 18 – Gráfico das médias referentes aos valores de área trabecular (%), considerando o tempo de reparo, mostrando grupos homogêneos (Tukey).

5.2.4 Área de osso trabecular nos grupos R, Cf e O

Os dados da estatística descritiva (média e desvio-padrão) referentes aos grupos ovariectomizados com os diferentes tratamentos, e aos tempos de reparo estão apresentados na Tabela 18 e representados na Figura 19.

Pôde-se observar que as médias dos valores de porcentagem de área trabecular nos grupos R, Cf e O mostraram comportamento semelhante em relação aos dias de observação através de valores em queda do sexto para o 12^o dia e aumento desses valores até o 24^o dia. Com exceção do sexto dia, quando o grupo R apresentou os maiores valores de porcentagem de área trabecular, em todos os outros dias de observação, foram encontrados no grupo O os maiores valores médios (Tabela 18).

Tabela 18 – Média e desvio-padrão dos dados de área trabecular (% do preenchimento) segundo as variáveis tratamento e tempo de reparo (dias)

Tempo de Reparo	n	Tratamentos (m±dp)		
		R	Cf	O
6	6	63,28 ±8,01	58,23 ±7,80	50,75 ±21,05
12	6	41,83 ±5,44	41,05 ±7,77	43,60 ±2,45
18	6	45,69 ±5,50	57,65 ±7,61	61,60 ±4,67
24	6	48,87 ±9,27	62,62 ±12,73	75,22 ±5,18

n = tamanho da amostra

R = Ovariectomizado + risedronato

Cf = Ovariectomizado + *Calcareia fluorica*

O = Ovariectomizado + placebo

m±dp = média ± desvio-padrão

A ANOVA da Tabela 19 mostrou que o fator tratamento e tempo foram significativos, bem como sua interação.

Tabela 19 – Resultado da ANOVA referente aos dados área trabecular (% do preenchimento) nos grupos R, Cf e O

Fonte de Variação	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	2	0,07605	0,03803	4,346	0,0172*
Tratamento	3	0,39690	0,13230	15,122	0,0000*
Interações	6	0,26439	0,04407	5,037	0,0003*
Resíduos	60	0,52493	0,00875		
Total	71	1,26			

*p<0,05

Quando realizado o teste de comparação múltipla de

Tukey (5%) (Tabela 20) verificou-se a formação de quatro grupos homogêneos indicando pouca diferença entre os tratamentos dentro dos períodos de observação, ou seja, os grupos apresentaram espaçamento intertrabecular bastante semelhantes.

Tabela 20 – Representação, em ordem crescente, das médias da área trabecular (%) dos grupos R, Cf e O após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Grupos	Tempo de Reparo (dias)	Média	Grupos Homogêneos			
Cf	12	41,05	A			
R	12	41,83	A			
O	12	43,60	A	B		
R	18	45,69	A	B	C	
R	24	48,87	A	B	C	
O	6	50,75	A	B	C	
Cf	18	57,65	A	B	C	D
Cf	6	58,23	A	B	C	D
O	18	61,60		B	C	D
Cf	24	62,62			C	D
R	6	63,28			C	D
O	24	75,22				D

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

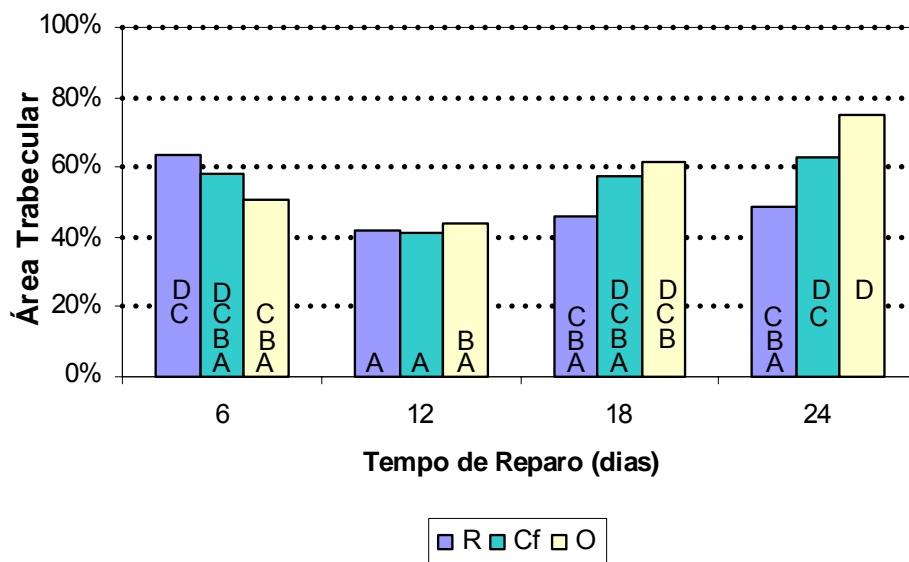


FIGURA 19 – Gráfico das médias referentes aos valores de área trabecular (%), considerando os tratamentos e os tempos de reparo, mostrando os grupos homogêneos (Tukey).

Confirmaram-se esses resultados quando comparadas as médias dos grupos dentro dos tempos de reparo (Figura 19). Aos seis, 12 e 18 dias, os grupos R, Cf e O não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si. Aos 24 dias o grupo O apresentou os maiores valores de área trabecular, sendo diferente do grupo R, com os menores valores. O grupo Cf mostrou valores intermediários entre os outros dois, mas sem diferenças estatisticamente significantes.

5.3 Análise histológica descritiva

Verificou-se, pela análise histológica, a presença de diferenças entre os grupos experimentais, tanto em relação ao tratamento quanto em relação aos períodos de observação. Em nenhum dos períodos e tratamentos observados verificou-se junção perfeita do osso novo com as bordas corticais do defeito.

5.3.1 Período de três dias

Os cortes histológicos já mostraram, neste período, nos grupos tratados tanto com *Calcareia fluorica* (Cf) como com risedronato (R), o início de formação óssea com a presença de tecido de granulação diferenciando em osso na periferia e no fundo do canal medular, originado a partir do endóstio, e preenchimento da região central do defeito e canal medular (área A) com tecido de granulação e, por vezes, coágulo bem formado, no entanto esses dois grupos diferiram em alguns aspectos. No grupo R o preenchimento da área A foi completo. Seu osteóide mostrou-se repleto de células osteogênicas e áreas com mineralização iniciada; nas áreas onde persistia a presença de tecido de granulação este se mostrou denso na periferia e mais frouxo no centro, com pequenos coágulos. No grupo Cf não houve preenchimento do fundo do canal medular e o tecido de granulação se apresentou mais fibroso.

Nos grupos S e O houve atraso na diferenciação, sem a ocorrência de formação de trabéculas e osteóide. No grupo S, o tecido de granulação era pobre em fibras colágenas e células, preenchia o fundo do canal medular enquanto que sua parte superior, além do defeito estavam preenchidos por coágulo estável, bastante fibrinoso. O grupo O (Figura

20a) mostrou-se ainda mais atrasado, com coágulo fresco ocupando toda área, quase sem tecido de granulação, que só apareceu em alguns cortes no fundo do canal medular.

5.3.2 Período de seis dias

Aos seis dias foi observado nos grupos R e Cf a presença de trabéculas finas e entrelaçadas, de distribuição homogênea, com a presença de muitos osteócitos e espaço intertrabecular preenchido por tecido de granulação. Observou-se certo atraso do grupo Cf em relação ao grupo R. O grupo R apresentava osso preenchendo todo o canal medular, quase sempre, até a superfície do defeito, sem entretanto formar ponte de osso cortical na união das bordas do mesmo e mostrando, poucas vezes, pequena quantidade de tecido de granulação na região mais central e superficial (Figura 20b). Alguns cortes apresentavam esquirolas ósseas envolvidas por osso neoformado. Já o grupo Cf mostrava uma área um pouco menor de preenchimento de osso, quase sempre deixando o fundo do canal medular livre e sem a ocorrência da nivelção óssea superficial, área que permaneceu com tecido de granulação na maioria dos cortes.

Os grupos O e S mostraram-se em fase anterior do processo de reparação quando comparados com os grupos R e Cf. Houve, neste período, formação óssea de trabéculas jovens, finas e com osteócitos volumosos que ocupavam somente o fundo e a periferia do canal medular, ficando grande parte da região preenchida pelo tecido de granulação e coágulo centrais. Esse tecido de granulação se mostrou repleto de vasos sanguíneos de diversos calibres e com pouca celularidade e fibras. No espaço intertrabecular do grupo S já havia a presença de tecido medular.

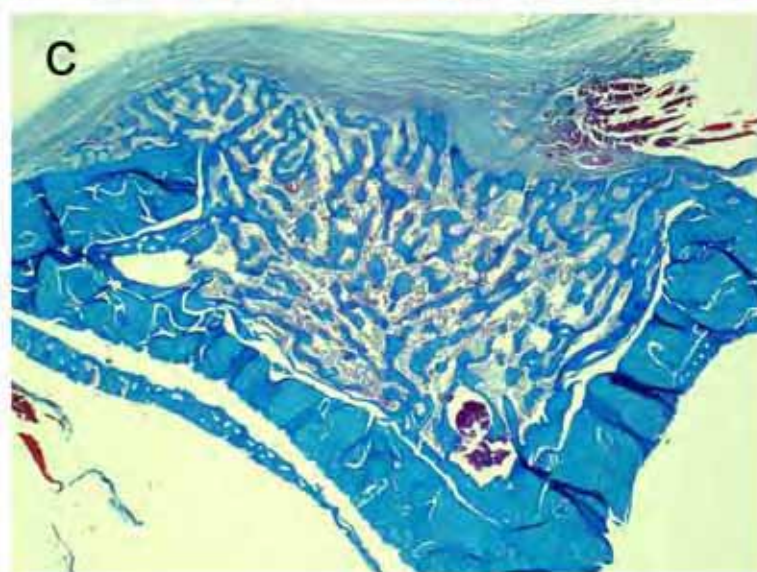
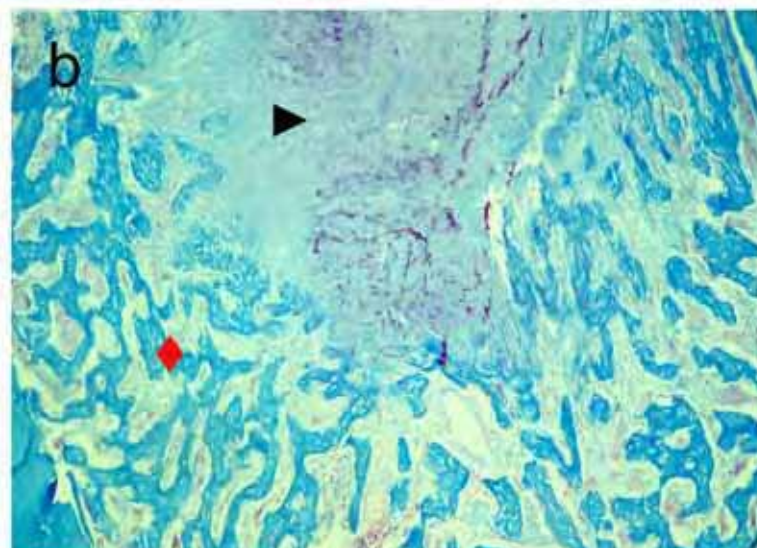
5.3.3 Período de 12 dias

No grupo R havia osso jovem e bastante celularizado preenchendo todo canal medular e formando ponte trabecular entre as bordas do defeito na maioria dos cortes (Figura 20c). Esse osso se mostrou com trabéculas grosseiras, de limites irregulares e aspecto desorganizado, apresentando formações semelhantes a envelados. O espaço intertrabecular estava preenchido por tecido conjuntivo fibroso com algumas áreas já apresentando tecido medular.

O grupo Cf diferenciou-se por mostrar sinais de remodelação óssea. Na periferia foi observada a presença de trabéculas maduras, sem osteóide e com osso menos celularizado enquanto no centro do defeito havia osso jovem e com bastante celularidade. Mostrava também liberação de parte do canal medular na maioria dos cortes. Os espaços intertrabeculares eram maiores e sem tecido de granulação, mas tecido medular.

Os grupos O e S apresentaram trabéculas jovens bastante celularizadas fazendo alinhamento no terço mais superficial da área A, mas com algumas áreas de tecido de granulação. Verificou-se a presença de tecido medular nos espaços intertrabeculares e no fundo do canal medular.

FIGURA 20 – Aspecto das fases iniciais do reparo ósseo; Tricrômio de Masson. a) grupo O, três dias, área do defeito e canal medular preenchidos por coágulo sangüíneo (■) e com início de formação de tecido de granulação (►). Aumento original 100x; b) grupo R, seis dias, área central do defeito preenchida por tecido de granulação (►) e formação de osso trabecular (◆), a partir da periferia do defeito e canal medular. Aumento original 100x; c) grupo R, 12 dias, calo ósseo totalmente formado por osso trabecular preenchendo área do defeito e canal medular. Aumento original 25x.



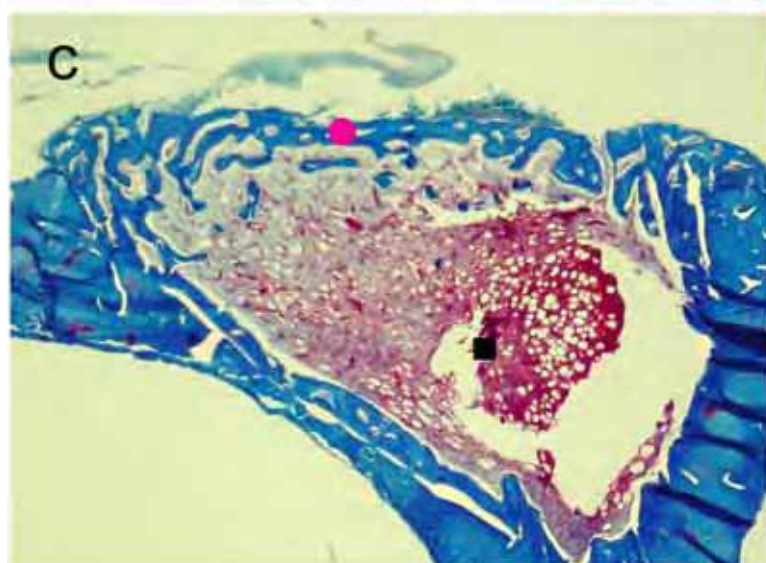
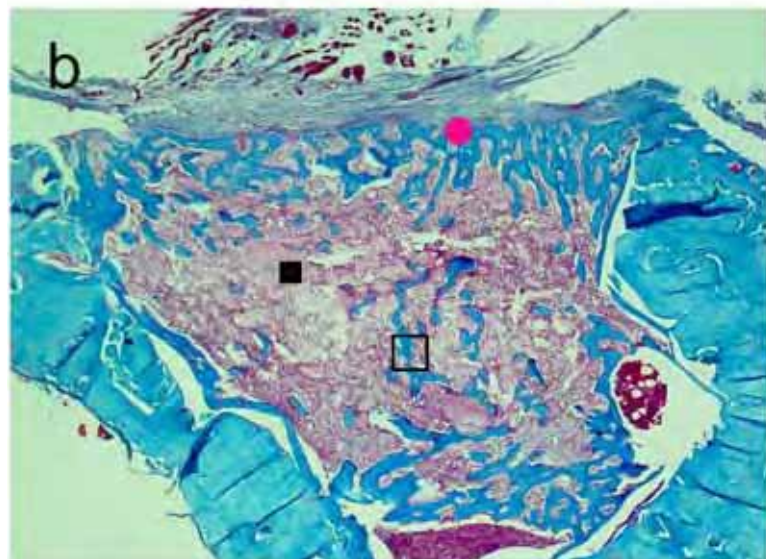
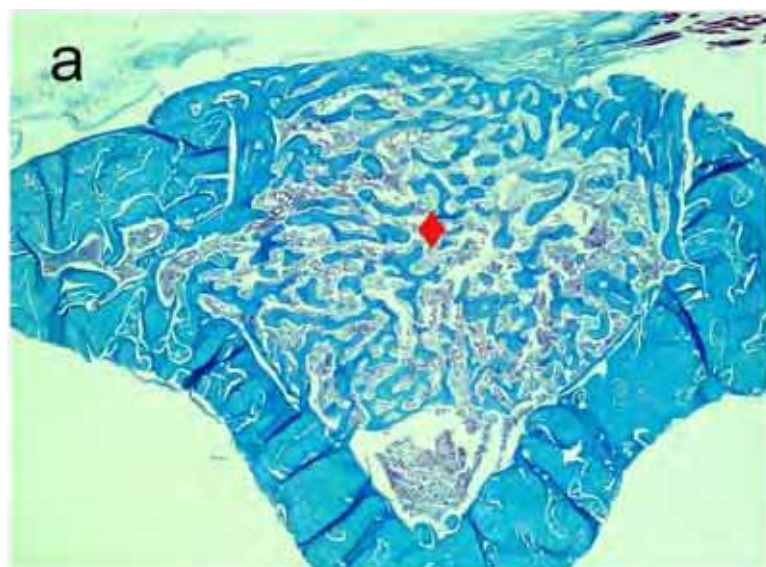
5.3.4 Período de 18 dias

Aos 18 dias o grupo R mostrava pobre remodelação com formação de ponte delgada unindo as extremidades do defeito, mas com permanência de osso trabecular em grande parte do canal medular (Figura 21a). As trabéculas ainda eram irregulares, com presença de algumas estruturas enoveladas e fendas (Figura 22c) alternando com áreas de osso com característica mais lamelar, com fibras orientadas, mas menos celularizadas que aos 12 dias.

No grupo Cf (Figura 21b) a remodelação foi mais acentuada, mostrando ponte óssea unindo as extremidades do defeito. Esse osso aproximava-se do aspecto de osso cortical, com certa continuidade, pequena espessura e pouca celularidade. Praticamente não havia mais osso no canal medular, somente alguns restos de trabéculas em alguns indivíduos.

Nos grupos O (Figura 21c) e S foi observada bastante similaridade com o grupo Cf, com trabéculas alinhadas e orientadas no sentido borda a borda no terço superficial do defeito e com o canal medular liberado. Estes grupos apresentavam osso com mais celularidade que o grupo Cf e de característica mais trabecular.

FIGURA 21 – Aspecto do reparo ósseo aos 18 dias; Tricrômio de Masson. a) grupo R, calo ósseo volumoso constituído por osso trabecular (◆) preenchendo área do defeito e canal medular, com ausência de remodelação. Aumento original 25x (+zoom digital 1,5x); b) grupo Cf, calo ósseo mostrando extensa remodelação (■) formando ponte óssea (●) alinhada com a superfície do defeito e manutenção de remanescentes ósseos (□) na área do canal medular. Aumento original 25x (+zoom digital 1,5x); c) grupo O, ponte óssea delgada (●) na superfície do defeito e canal medular liberado (■). Aumento original 25x (+zoom digital 2,2x).

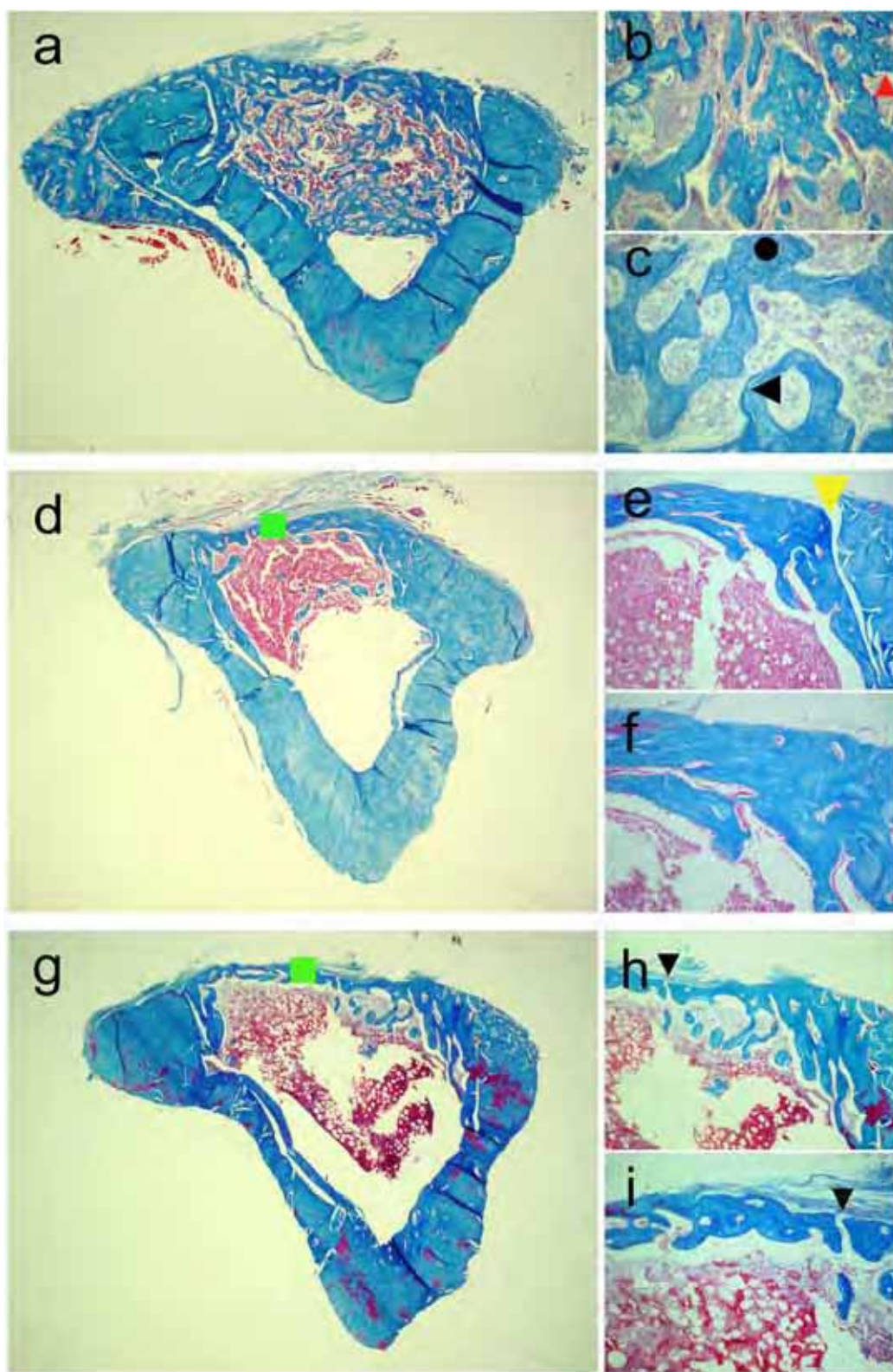


5.3.5 Período de 24 dias

Foi observado que o grupo R ainda apresentava trabéculas ocupando cerca de 2/3 da área A (Figura 22a), mas com sua organização e orientação superficial mostrando aspecto semelhante a osso cortical. A presença das estruturas enoveladas (Figura 22c) diminuiu, o osso tinha aspecto mais maduro, com pouca celularidade e permanência de áreas com osso mais jovem.

Os grupos Cf, O e S apresentaram ponte óssea ora formando lâmina cortical contínua (Figura 22d), ora mostrando perda de continuidade (Figura 22h), ligando as bordas do defeito sem, entretanto, apresentar união com o osso cortical velho (Figura 22e). Essa ponte era formada por osso maduro (Figuras 22f e 22i) e com pouca celularidade de espessura variável, mas bastante delgada, não atingindo a espessura do osso cortical da borda do defeito.

FIGURA 22 – Aspecto do reparo ósseo aos 24 dias. a, b, c: grupo R; d, e, f: grupo Cf; g, h, i: grupo O; Tricrômio de Masson. a) calo volumoso de osso trabecular preenchendo área do defeito e grande parte do canal medular. Aumento original 25x; b) trabéculas com contorno (▲) e celularidade irregulares. Aumento original 200x; c) trabéculas de textura irregular mostrando fendas (◄) e enovelados (●). Aumento original 200x; d) calo bastante remodelado com formação de ponte delgada (■) de osso lamelar na superfície do defeito. Aumento original 25x; e) ausência de união da ponte óssea com o osso cortical (▼). Aumento original 100x; f) osso de aspecto lamelar. Aumento original 200x; g) calo bastante remodelado com formação de ponte óssea delgada (■) na superfície do defeito. Aumento original 25x; h) lâmina óssea bastante delgada e com áreas de descontinuidade (▼). Aumento original 100x; i) osso predominantemente trabecular, com bastante celularidade e com áreas de descontinuidade (▼). Aumento original 200x.



6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de comparar o efeito de dois medicamentos na reparação óssea em animais com alterações metabólicas que interferem na formação e remodelação óssea, um medicamento alopático, o risedronato e outro homeopático, a *Calcarea fluorica* 6CH, foi realizado este estudo experimental em ratas ovariectomizadas.

Os ratos são os animais usados com mais frequência como modelo experimental de osteoporose (JEE⁴⁴, 1995; SZEJNFELD¹⁰², 2000; NAMKUNG-MATTHAI et al.⁶⁹, 2001; TURNER¹⁰⁸, 2001; TURNER et al.¹⁰⁹, 2001; EGGERMANN et al.³⁰, 2005). São também amplamente utilizados em experimentos sobre doenças ósseas e testes farmacológicos. A perda óssea induzida pela ovariectomia em ratas tem muitas características similares à perda óssea pós-menopausa em humanos, entre elas, algumas de importância para este estudo como: aumento na taxa de remodelação óssea com a taxa de reabsorção excedendo a taxa de formação óssea, uma fase inicial de perda óssea rápida seguida de uma fase muito mais lenta e resposta terapêutica óssea similar com o uso de bifosfonatos entre outros medicamentos (KALU⁴⁶, 1991).

Ratos fêmeas são usados mais frequentemente que os machos (FUKUDA & IIDA³², 2004), pois 80% dos casos de osteoporose ocorrem em mulheres após a menopausa.

Modelos animais com roedores são frequentemente utilizados para examinar a reparação de fraturas femorais, tibiofibulares ou fibulares (WALSH et al.¹¹⁶, 1997), e essas pesquisas são de grande

importância, pois a taxa de mortalidade, a morbidade e os custos representam grandes prejuízos trazidos pela osteoporose e suas fraturas.

Estudos histológicos de reparação óssea (WALSH et al.¹¹⁶, 1997; NAMKUNG-MATTHAI et al.⁶⁹, 2001; EGGERMANN et al.³⁰, 2005) verificaram que a osteoporose muda o curso da reparação óssea causando um atraso na formação do calo ósseo e na diferenciação de células ósseas que participam do processo, apresentando persistência de tecido fibroso imaturo em animais OVX em períodos de reparação nos quais animais *sham* já apresentam formação óssea.

No presente estudo também foram observadas diferenças na velocidade de diferenciação celular dentro do defeito, havendo no grupo O permanência de coágulo e, posteriormente, de tecido de granulação por mais tempo que no grupo S, que apresentou uma formação mais precoce de tecido medular intertrabecular. Essas diferenças só foram observadas nos períodos de três e seis dias. Nos períodos posteriores houve tendência à aproximação da aparência morfológica e celular entre os grupos O e S.

Também a média das porcentagens de quantidade de osso formado foi menor no grupo O (33,88%) quando comparado ao grupo S (41,17%), com diferença estatisticamente significativa, concordando com os estudos de Amadei³ (2004), Silveira⁹⁵ (2004) e Eggermann et al.³⁰ (2005) que relataram formação de calo ósseo menor nos animais ovariectomizados.

Esta evidência física de reparação óssea alterada na osteoporose tem grande importância na avaliação de tratamentos para osteoporose e seus potenciais efeitos na reparação de fraturas ou defeitos ósseos.

Segundo Stepan et al.⁹⁸ (2003) a histomorfometria óssea é o método de escolha para o estudo das consequências do uso de medicamentos com distintos mecanismos de ação tecidual, o que é o caso deste estudo, que usa um medicamento alopático e um

homeopático. Optou-se aqui pela quantificação da porcentagem de área preenchida por osso em relação à área total disponível no defeito criado e canal medular, técnica que expressa a quantidade real de osso formado, mediante a ação dos diferentes medicamentos, nos cortes analisados e não a expressão de somente uma área selecionada no defeito ou de uma projeção da quantidade de osso formado através da contagem de pontos de intersecção de um retículo graduado sobreposto ao tecido ósseo. Também a segunda análise histomorfométrica de porcentagem de área de osso trabecular dentro da área preenchida por osso, excluindo a participação de tecido mole intertrabecular, forneceu subsídios para verificar se os tratamentos interferiam na disposição das trabéculas ósseas e se havia espaçamento intertrabecular maior nos animais tratados com um medicamento ou outro.

Neste estudo optou-se pela realização da ovariectomia em ratas jovens (três meses de idade) e aguardou-se 35 dias para que os seus efeitos na perda óssea fossem estabelecidos antes da realização dos defeitos. Esta escolha foi suportada por informações obtidas na literatura. Diversos estudos histomorfométricos, sobre reparação e qualidade ósseas, têm utilizado ratas ovariectomizadas aos três meses de idade (PENG et al.⁷⁹, 1997; WALSH et al.¹¹⁶, 1997, CAO et al.¹⁷, 2002; AMADEI³, 2004; SILVEIRA⁹⁵, 2004; TIVESTEN et al.¹⁰⁶, 2004). Kalu⁴⁶ (1991) enfatiza que ratos jovens, com aproximadamente três meses de idade são facilmente disponíveis e baratos e, principalmente, manifestam os efeitos da ovariectomia em um mês ou menos, com perda óssea com características próximas da encontrada no rato senil.

Wronski et al.¹¹⁹ (1989) relataram que em ratas ovariectomizadas aos três meses foi observada dramática perda óssea trabecular na região proximal da tíbia, que foi progressiva e evidente após duas semanas, mas inequívoca após um mês. Resultado similar foi encontrado por Thompson et al.¹⁰⁵ (1995) com aumento da remodelação óssea, estreitamento e perda de elementos trabeculares no 14^o dia após a

OVX. Esses autores indicam que ratos em crescimento respondem com uma perda óssea mais rápida e em maior magnitude que ratos adultos após OVX e recomendam que a OVX para indução de osteoporose seja realizada em animais de três meses de idade e ainda sugerem que, provavelmente, estudos de agentes com potencial terapêutico sejam feitos com não mais que seis meses de duração após a OVX.

Os 35 dias utilizados neste estudo foram suficientes para gerar diferenças na reparação ocorrida nos animais OVX quando comparados aos animais *sham*, principalmente nos períodos de observação de três e seis dias, mas não impediu a formação do calo ósseo bastante volumoso aos 12 dias. Esses dados indicam que após 35 dias de ovariectomia podemos observar atraso na diferenciação celular nas fases iniciais de reparação, mas sem haver muita interferência na formação óssea posterior.

A metáfise da tíbia proximal mostra considerável perda óssea após ovariectomia (SIMS et al.⁹⁷, 1996). Namkung-Matthai et al.⁶⁹ (2001) mostraram secções de tíbia com evidência de elevada remodelação óssea, demonstrada pela incorporação aumentada de tetraciclina.

O conhecimento de que a tíbia é um osso bastante envolvido na osteoporose associado à presença de poucos planos teciduais sobrepostos que conferem facilidade de acesso cirúrgico levou à escolha da tíbia para a realização dos defeitos ósseos desse estudo. Os defeitos ósseos foram preferidos à realização de fraturas completas por estarem menos sujeitos a fatores mecânicos e obstruções de suprimento sangüíneo, conforme explicitado por Schenk⁹⁰ (1994), além de permitirem uma padronização do tamanho da lesão óssea e controle da quantidade de necrose no local, tanto de tecido ósseo como de tecido mole adjacente. Além disso, defeitos monocorticais evitam o atraso da reparação que ocorre quando há invasão de tecidos conjuntivo e muscular adjacentes para o local do defeito (ALKAN et al.¹, 2002)

eliminando a necessidade de uso de barreiras e tornando o procedimento cirúrgico simplificado.

Neste trabalho, todos os animais tiveram os defeitos criados fechados linearmente durante o período de observação indicando que o tamanho de 2,5 mm de diâmetro utilizado não foi crítico. Para Gosain et al.³⁵ (2000) que sugerem uma análise tridimensional do defeito considerando o volume de osso formado ou, pelo menos uma análise bidimensional da porcentagem de osso dentro da área do defeito, esse defeito seria considerado de tamanho crítico, pois não houve, em três grupos, após os 24 dias de observação, preenchimento completo da área do defeito (Cf 23,41%; O 21,25% e S 29,29%), que deveria corresponder a aproximadamente 30,21±5% da área total A. Os valores encontrados demonstram que houve a formação de uma ponte de espessura bastante menor que a espessura da cortical das margens do defeito, pois estes valores se referem não só ao osso que formou a ponte óssea, mas também às trabéculas remanescentes na área do canal medular. Sendo ainda mais rigorosos no conceito de tamanho crítico, mesmo no grupo R o tamanho poderia ser considerado crítico uma vez que mostrava a área do defeito toda preenchida por osso aos 24 dias, mas esse osso era trabecular, não ocupando 100% do espaço do defeito por causa da presença dos espaços intertrabeculares.

Durante a reparação óssea, o calo é remodelado, sendo continuamente reabsorvido e formado até a obtenção da arquitetura e da integridade mecânica normais no osso restaurado (LI et al.⁵⁹, 2001). Neste estudo a remodelação não chegou ao seu final em todos os grupos experimentais, no entanto, foi notado que os grupos Cf, O e S remodelaram seu calos, mas formaram uma ponte delgada de osso cortical de espessura bem menor que a da cortical original. Já o grupo R mostrou atraso na remodelação óssea com permanência de calo volumoso composto por osso trabecular aos 24 dias.

A reparação óssea depende, no seu período mais longo e

final, da taxa de remodelação óssea (LI et al.⁵⁹, 2001). O atraso da remodelação e da maturação óssea levando a formação de osso lamelar no grupo R está em concordância com vários estudos que analisaram o uso de bifosfonatos na reparação óssea em ratos (LI et al.⁶⁰, 1999; LI et al.⁵⁹, 2001; CAO et al.¹⁷, 2002; NAGASHIMA et al.⁶⁸, 2005) e também observaram atraso na substituição do osso primário por osso lamelar com o uso de diferentes bifosfonatos, inclusive do risedronato.

Li et al.⁵⁹ (2001) afirmaram que a reparação não é completa enquanto não houver a união óssea nas bordas do defeito radiograficamente, o que acontece antes da união histológica. Esse atraso de união é clinicamente problemático, podendo trazer risco de novas fraturas (AMANAT et al.⁴, 2005).

Neste estudo apresentado foi constatada uma falha, pois não foi observada a união histológica do osso neoformado com as margens corticais do defeito ósseo em nenhum dos grupos e tratamentos. De fato, não se pode prever então quando haverá a regeneração óssea completa desses defeitos em cada tratamento proposto, não sendo possível responder ao questionamento de qual medicamento, risedronato ou *Calcareia fluorica*, ou até mesmo, o placebo, irá promover essa regeneração em menor tempo.

O atraso na reparação ou uma não união óssea pode ser uma devastadora complicação de uma fratura mesmo após uma longa recuperação (AMANAT et al.⁴, 2005). Assim, alguns autores chegaram a sugerir (LI et al.⁶⁰, 1999; CAO et al.¹⁷, 2002) que se deveria interromper o uso de medicamentos para osteoporose em casos de fraturas não vertebrais por conta do atraso da remodelação do calo, já que o objetivo é a regeneração óssea, com formação de osso de estrutura histológica e propriedades biomecânicas iguais às originais (LI et al.⁶⁰, 1999). No entanto, esses mesmos autores acabaram por concluir que os bifosfonatos atrasam a remodelação do calo, mas não prejudicam a recuperação da integridade biomecânica da fratura, pois levam à

formação de um calo maior que reflete uma adaptação segura da fratura para a presença de osso de qualidade estrutural e mecânica inferior ao lamelar. Amanat et al.⁴ (2005) complementam que o atraso na remodelação do calo primário na presença do medicamento pode ser benéfico por favorecer o aumento do tamanho deste calo aumentando a resistência do reparo inicial principalmente na presença de implantes intra-ósseos.

De qualquer modo, como foi demonstrado por Nancollas et al.⁷⁰ (2006), o risedronato tem menor afinidade pelo osso que o alendronato, bifosfonato utilizado no estudo de Cao et al.¹⁷ (2002). Portanto, os efeitos de atraso na remodelação do calo podem acontecer por um período de tempo menor que o promovido pelo alendronato não sendo necessária a interrupção da administração desse medicamento em pacientes com ocorrência de fraturas.

Assim, parece ser uma característica de todas as classes de bifosfonatos a formação de calo ósseo maior, com forte inibição da remodelação e maturação (CAO et al.¹⁷, 2002), em consequência da inibição dos osteoclastos promovida por estes medicamentos, havendo somente uma variação do período de inibição promovida pelos diferentes bifosfonatos como demonstram os estudos de Li et al.⁵⁹ (2001) e Cao et al.¹⁷ (2002) onde não houve remodelação do calo após 49 semanas sob tratamento com o incadronato e de 16 semanas sob tratamento com alendronato, respectivamente.

Nesse estudo, o grupo O, aos 24 dias mostrava ponte óssea delgada e remodelada de osso cortical, mesmo que com descontinuidade em alguns pontos, o que deve ser uma consequência da maior taxa de remodelação óssea promovida pela ovariectomia, através da deficiência dos hormônios ovarianos.

Também no presente estudo, o tamanho do calo formado nos animais tratados com risedronato foi maior que nos grupos que receberam placebo e *Calcareo fluorica*. Atualmente vem sendo sugerido

nas publicações que os bifosfonatos têm efeitos anabólicos na massa óssea (COMPSTON¹⁹, 1994) e acabam por promover aumento do tamanho do calo ósseo (LI et al.⁶⁰, 1999; LI et al.⁵⁹, 2001; CAO et al.¹⁷, 2002; KOIVUKANGAS et al.⁵⁰, 2003).

No estudo de D'Aoust et al.²⁵ (2000) comprovou-se efeito do etidronato aumentando a marcação imunoistoquímica de osteopontina e de sialoproteína óssea e aumentando a formação de tecido osteóide/mineralizado em defeitos ósseos, mas não houve comprovação de aumento da proliferação de células precursoras de osteoblastos. Concluíram então, que o etidronato promove diferenciação de osteoblastos.

Estudos mais recentes (IM et al.⁴², 2004; VON KNOCH et al.¹¹⁴, 2005) parecem comprovar o efeito dos bifosfonatos alendronato e risedronato na proliferação e diferenciação de células de culturas de osteoblastos através da promoção do aumento do número de células em relação aos controles e aumento da expressão de fosfatase alcalina, BMP-2, colágeno tipo I, osteocalcina e sialoproteína II.

Através do presente estudo não se pode confirmar estes dados, mas a observação histológica nos diferentes tempos de reparação analisados permite que se afirme que o risedronato apresentou efeito estimulatório da formação óssea, uma vez que, aos três dias havia início de formação de trabéculas ósseas na área do defeito dos animais do grupo R, sendo que tal fato não ocorreu nos grupo O e nem sequer nos indivíduos normais do grupo S. Esse estímulo gerou os resultados encontrados que foram formação mais precoce de osso nos grupo R e formação de maior quantidade de osso primário nesse grupo, que se manteve superior aos seis (80,86%) e 12 dias (98,21%). A formação de osso secundário ou lamelar parece ter sido inibida numa fase subsequente da reparação, aos 18 e 24 dias, através da inibição da reabsorção osteoclástica que antecede esta fase.

Mesmo com essa evidente ação do risedronato na

formação óssea e, portanto, nos osteoblastos, poder-se-ia afirmar que os osteoclastos são células mais sensíveis ao tratamento com esse medicamento que os osteoblastos, havendo maior interferência na reabsorção do que na formação óssea.

O mesmo não pode ser dito sobre o medicamento homeopático utilizado, a *Calcarea fluorica*. Assim como o grupo R, o grupo Cf também mostrou evidências de estimulação da formação óssea aos três dias, com aumento rápido da massa óssea até os seis dias (60,87%), ultrapassando os valores do grupo O (24,56%) e S (33,86%) e crescente até os 12 dias (65,38%), mas este medicamento parece não interferir na remodelação óssea, uma vez que se observou depois uma extensa remodelação e substituição do osso primário por lamelar, se comportando esse grupo, a partir dos 12 dias, de forma semelhante ao grupo O.

Experimentos em homeopatia veterinária mostram resultados bastante promissores em ensaios controlados em animais, onde o efeito placebo é menos provável (BOYD¹⁴, 2003).

O cálcio e o flúor têm várias ações sobre os tecidos ósseos. A combinação química de cálcio e ácido fluorídrico gera a *Calcarea fluorica*, um medicamento duplo com natureza e propriedades novas. Esse medicamento pode manter algumas ações da cal e do ácido fluorídrico, mas talvez apresente propriedades diferentes das observadas nas duas substâncias isoladamente (NOÇÕES⁷⁵, 1980).

Segundo a teoria de Schuessler um método bioquímico substitui os esforços curativos da natureza pelas substâncias minerais que fazem falta nas partes afetadas dos tecidos. Esses medicamentos bioquímicos são representados por sais minerais que podem ser repostos no organismo através de medicamento homeopáticos formulados em baixa potência (6CH) ou em trituração e apresentam patogenesia sob o ponto de vista homeopático, com ação descrita nas matérias médicas. Alguns medicamentos homeopáticos constitucionais são indicados para

tratamento de osteoporose. A *Calcarea fluorica* é um deles e mostra afinidade óssea (NOÇÕES⁷⁵, 1980; KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984).

O complexo FMS *Calciumfluor* foi usado no estudo de Palermo et al.⁷⁶ (1999), que mostrou promover osteogênese *in vitro*, mas não analisou seus efeitos *in vivo*. No estudo de Palermo et al.⁷⁶ (1999), foi usada homeopatia complexa de ressonância, isto é com o uso de três medicamentos preparados simultaneamente, *Calcarea fluorica*, *Silicea* e *Magnesia phosphorica*, e foi observado um efeito dose dependente do complexo CalciumFluor. Isso sugere que este medicamento não agiu como medicamento homeopático, que teria a potência aumentada com o maior número de diluições. Outro fato curioso é a realização do estudo *in vitro* contrariando os preceitos da terapia homeopática que explica a resposta ao medicamento como uma resposta do organismo como um todo, não podendo assim ter seus resultados extrapolados para uma condição *in vivo* (BOYD⁸, 1993; KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984). A atividade do medicamento homeopático é proporcional à sua homeopaticidade (ou semelhança com os sintomas do doente) e ao seu grau de dinamização ou potencialização que, quanto maior, maior é a atividade medicamentosa. Portanto, a atividade do medicamento é proporcional a estas duas observações e não à sua quantidade (NASSIF⁷¹, 1995).

No presente estudo, a *Calcarea fluorica* foi escolhida a fim de verificar sua atuação na forma homeopática tradicional: *in vivo* e como medicamento único, mesmo sem a possibilidade de individualização do tratamento.

Assim, foi possível comprovar, *in vivo* que a *Calcarea fluorica* agiu positivamente na formação óssea, mas por um período de tempo muito curto e sem interferência na remodelação óssea e na melhora da condição clínica do indivíduo. O medicamento não se mostrou totalmente eficiente e vantajoso talvez porque não tenha sido feita a individualização do tratamento. Achar o medicamento certo para um dado

indivíduo e situação é a chave do funcionamento da homeopatia (KOSSAK-ROMANACH⁵², 1984). Isso é obtido pela individualização do tratamento. Trabalhando com ratos não foi possível verificar essa variável. No entanto, são usados tratamentos homeopáticos na veterinária com vários relatos de sucesso, baseados na escolha dos medicamentos não apenas pela individualização do caso, mas também pela possibilidade de ação tecidual dos medicamentos, como é o caso dos medicamentos constitucionais (NOÇÕES⁷⁵, 1980; SCHOEN & WYNN⁹¹, 1998).

A análise da porcentagem de área trabecular dentro do osso neoformado no calo nos permitiu concluir que, nas diferentes condições experimentais, os tratamentos e a presença ou ausência de ovariectomia não interferiram no tipo de osso formado no reparo, dada a ausência de significância entre as condições experimentais. Assim, animais ovariectomizados ou *sham* mostraram quantidade de osso trabecular semelhante dentro da área de preenchimento. O tempo de reparação por sua vez interferiu nesses resultados, mostrando valores decrescentes até os 12 dias, e crescentes aos 18 (57,29%) e 24 dias (73,74%), indicando a ocorrência de remodelação óssea e uma tendência à substituição do osso trabecular por osso cortical na área do defeito.

Na análise que considerou os animais ovariectomizados nas diferentes condições relativas aos diferentes medicamentos, homeopático, alopático e placebo, a interação entre os fatores tempo e tratamento nos leva a considerar os tratamentos dentro de cada dia de reparação. Assim, aos seis, 12 e 18 dias, observa-se que não houve diferenças entre os tratamentos no que diz respeito à porcentagem do osso dentro da área de preenchimento e aos 24 dias vê-se diferenças estatisticamente significantes somente entre o grupo R (48,87%) e O (75,22%), o que se explica pela grande deficiência de remodelação do osso primário e de formação de ponte de osso cortical no grupo R, comportamento extremamente diferente do ocorrido no grupo O que, como já explicado, sofreu intensa remodelação do osso neoformado, que

foi substituído por osso lamelar formando uma ponte cortical.

Enfim, essa semelhança dos valores da porcentagem de osso trabecular observado nos diferentes tratamentos vem valorizar os dados obtidos através da área de preenchimento (volume do calo), reforçando que esses valores e suas diferenças entre os grupos expressam diferenças reais de quantidade de osso, já que o osso neoformado apresenta semelhanças de área trabecular dentro dos períodos de observação para os diferentes tratamentos.

Dessa forma, a análise histomorfométrica realizada pela associação dessas duas medidas de formação óssea se mostrou um método bastante fiel de quantificação de formação óssea dentro de um defeito cortical criado cirurgicamente.

É importante salientar que a análise histomorfométrica realizada compreende uma região representada por quatro cortes da área central do defeito. Na evolução do reparo esta é a última área a ter formação de osso, a qual ocorre a partir das bordas do defeito e da membrana endosteal, e é também a última área a sofrer remodelação, representando assim a região em que o processo de reparação se encontra mais atrasado em relação às demais áreas do defeito.

Para a realização da análise da densidade óptica foi usada a radiografia digital direta pela técnica do paralelismo com distância focal de 40 cm e colocando a face na qual se encontrava a lesão óssea voltada para o sensor, diminuindo o espaço entre objeto e sensor, e centralizada na área ativa do mesmo. Este posicionamento satisfaz as condições de Schulze & D'Hoedt⁹² (2002) para obtenção de imagem com a melhor projeção no filme ou sensor, que são raios X paralelos devido à distância fonte/objeto e incidindo perpendicularmente ao filme ou sensor e ao objeto. O objetivo foi obter aumentada acurácia da radiografia e, conseqüentemente, menor distorção da imagem.

O uso de radiografias digitais diretas possibilita a realização de radiografias com obtenção de imagens imediatas,

rapidamente transferidas e arquivadas para um computador que podem ser analisadas por programas de fácil acesso e de domínio público, como é o caso do *Image Tool*. A análise das radiografias por computador pode ser útil, uma vez que o diagnóstico do radiologista é baseado em avaliação subjetiva, estando sujeito a variações intra e interpessoais, bem como perda de informação devido à natureza sutil do achado radiológico, fadiga visual ou distração (AZEVEDO-MARQUES⁶, 2001). A imagem digital formada fornece uma informação de 256 níveis de cinza, porém o olho humano reconhece aproximadamente 32 tons de cinza. Assim, o programa *Image Tool* auxiliou na quantificação de características da imagem que expressavam a densidade do tecido neoformado no defeito criado cirurgicamente, a densidade óptica (DO) do defeito que, dependendo do grau de contraste da imagem pode não ser compatível de ser analisado pela visão humana.

Apesar das qualidades e vantagens da radiografia digital, a análise radiográfica falhou em demonstrar a quantidade de tecido ósseo neoformado na região do defeito. Quando comparados os grupos O e S, a avaliação da densidade óptica não demonstrou diferença entre esses grupos em nenhum período de observação que não fosse os três dias de reparo, justamente o período em que se verificou, posteriormente, pela análise histológica, não haver formação óssea nesses grupos. As diferenças encontradas na DO desses dois grupos aos três dias deve ter sido encontrada por diferenças na leitura radiográfica da cortical óssea sobreposta ao defeito monocortical e de tecidos moles.

O grupo S mostrou valores de DO crescentes até o 12^o dia, com manutenção dos valores alcançados até o 24^o dia, mesmo tendo sido verificado através da histomorfometria uma redução da área preenchida por osso a partir do 12^o dia. As alterações morfológicas que ocorreram no osso durante o experimento foram bastante significativas para não promoverem alterações na DO significativas e detectáveis. O grupo O manteve valores de DO sem diferenças significantes durante

todos os períodos de observação, também não fazendo um paralelo com o observado na análise histomorfométrica.

Nos grupos ovariectomizados e tratados, os grupos R e Cf mostraram valores de DO sem diferenças estatisticamente significantes nos tempos de reparo de três, seis e 12 dias. Aos 18 e 24 dias o grupo R mostrou os valores mais altos, com diferença estatisticamente significativa dos outros grupos, demonstrando presença de maior massa óssea, o que ocorreu devido à inibição de remodelação proporcionada pelo risedronato.

Outro estudo radiográfico da densidade óssea usando radiografias digitais em lesões em tíbia de ratos SHR usando risedronato, *Calcareia fluorica* e *Calcareia phosphorica* por sete e 21 dias mostrou valores de DO sempre maiores para o risedronato, seguido da *Calcareia phosphorica*, mas sem diferenças significativas deste último para a *Calcareia fluorica* (SENRA et al.⁹³, 2004).

Pode-se sugerir também que os valores mais altos de DO no grupo tratado com risedronato se deva, em parte, a uma maior mineralização do calo ósseo, como acontece com outro aminobifosfonato, o alendronato (CAO et al.¹⁷, 2002).

Possivelmente, vários fatores influenciam a densidade do tecido ósseo e do tecido neoforado no defeito, além da quantidade de osso neoforado, como o grau de mineralização do tecido, a maturação óssea, a transformação do osso trabecular em lamelar compacto e a remodelação.

Segundo Werkman¹¹⁷ (2005), os tratamentos estão relacionados com diferentes alterações morfológicas como variação na quantidade, espessura e qualidade das trabéculas, na celularidade apresentada nos tecidos do calo ósseo e no grau de mineralização. A alta variabilidade dos fatores observados, quando em conjunto, podem possivelmente interferir de maneira direta na variação da densidade óptica.

Associado a isso há também as deficiências no método

de avaliação radiográfico. Alguns autores afirmaram que o exame radiográfico apresenta pouca sensibilidade, revelando alterações na massa óssea quando esta já é maior do que 30-50% (RADOMINSKI et al.⁸¹, 2002; GUEDES JÚNIOR et al.³⁶, 2003; LANGER⁵⁶, 2004; BRANDÃO & HAUACHE¹⁶, 2005).

Outro fator que possivelmente interfere em análises de estruturas tão pequenas é o processamento das informações radiográficas. O processamento da imagem pelo computador é baseado em estatísticas locais (média e desvio-padrão) dos valores de cinza dos *pixels* contidos em uma região com a finalidade de realizar a binarização da imagem, isto é, de transformá-la em uma imagem digital (AZEVEDO-MARQUES⁶, 2001). Para Wagner et al.¹¹⁵ (2005) este processamento da imagem pode manipular o aspecto visual da densidade óptica levando a uma representação irreal da densidade do objeto, diferentemente da radiografia convencional, que têm contrastes mais definidos que a radiografia digital. Essa alteração da imagem digital poderia ser uma das causas que levaram à perda de informação radiográfica do objeto e interferiu na análise de imagens com diferenças sutis de densidade, como é o caso das tíbias de ratos.

Alguns estudos da literatura (LI et al.⁶⁰, 1999; LI et al.⁵⁹, 2001; CAO et al.¹⁷, 2002) têm utilizado radiografias realizadas com *soft X-ray*, que possui menor corrente e potência (kVp) para a análise radiográfica da reparação de fêmures fraturados de ratos.

O risedronato, neste estudo, estimulou formação de grande calo ósseo, com inibição de remodelação, mas o aspecto irregular do osso neoformado, com bordas de trabéculas indefinidas, aspecto de fibras desorganizadas formando estruturas enoveladas trazem preocupações a respeito da qualidade do osso neoformado. Estudos de histologia óssea realizados em mulheres com osteoporose tratadas com risedronato, 5mg diários, sem fraturas, indicam que o osso formado durante o tratamento é de qualidade normal (RISEDRONATE⁸⁵, 2001).

Mas fica o questionamento de qual é a qualidade do osso formado em defeitos ósseos e fraturas sob tratamento contínuo com risedronato, uma vez que a qualidade óssea depende de vários fatores.

O osso primário deve ser um osso provisório, pois tem disposição de fibras e mineralização irregulares, osteócitos grandes, numerosos e distribuídos aleatoriamente. A composição mineral e colágena e as características estruturais da matriz óssea também interferem na resistência óssea e a organização lamelar fornece a maior densidade de colágeno por volume de tecido, sendo estruturalmente importante para o osso cumprir suas funções mecânicas. O importante papel dos osteoclastos na regulação da formação óssea osteoblástica, particularmente no desenvolvimento de matriz óssea lamelar descrito por DAI et al.²⁶ (2004) poderia ser suprimido com o uso de medicamentos inibitórios da ação osteoclástica.

Há necessidade de estudos mais prolongados usando o risedronato para se verificar após quanto tempo haverá a regeneração completa do osso da lesão com o restabelecimento das características histológicas e mecânicas normais do osso cortical e se ela ocorrerá sob tratamento contínuo ou em longo prazo com este medicamento.

Esse estudo conseguiu demonstrar que a *Calcareo fluorica* teve ação tecidual uma vez que estimulou o reparo em sua fase inicial, apesar da observação ter sido puramente descritiva. Assim, se fazem necessárias mais pesquisas com medicamentos homeopáticos, que sejam realizadas com maior rigor científico, abordando não só aspectos clínicos, mas também aspectos bioquímicos, histológicos, fisiológicos e de biologia molecular entre outros, buscando a compreensão dos mecanismos de ação dos mesmos.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados, sob as condições experimentais utilizadas, possibilitou concluir que:

e) a ovariectomia prejudicou a reparação óssea na ausência de tratamento específico;

f) o risedronato foi o que estimulou maior formação óssea;

g) o risedronato inibiu a remodelação e maturação ósseas;

h) a *Calcareia fluorica* 6CH estimulou formação óssea nas fases iniciais da reparação;

i) a *Calcareia fluorica* 6CH não inibiu a remodelação e maturação ósseas.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 ALKAN, A. et al. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.60, n.8, p. 898-904, 2002.
- 2 ALLISTON, T. et al. TGF- β induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoclast differentiation. **EMBO J**, v.20, n.9, p.2254-72, May 2001.
- 3 AMADEI, S.U. **Estudo comparativo dos efeitos da isoflavona e da ipriflavona na reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas**. 2004. 108f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2004.
- 4 AMANAT, N. A single systemic dose of pamidronate improves bone mineral content and accelerates restoration of strength in a rat model of fracture repair. **J Orthop Res**, v.23, n.5, p.1029-34, Sept. 2005.
- 5 ATHANASOU, N.A. Cellular biology of bone-resorbing cells. **J Bone Joint Surg**, v.78, n.7, p. 1096-113, July 1996.

* Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Informação e documentação**: referências, elaboração NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 23p.

- 6 AZEVEDO-MARQUES, P.M. Diagnóstico auxiliado por computador na radiologia. **Radiol Bras**, v.34, n.5, p.285-93, 2001.
- 7 BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 390p.
- 8 BARGER-LUX, M.J.; RECKER, R.R. Bone microstructure in osteoporosis: transilial biopsy and histomorphometry. **Top Magn Reson Imaging**, v.13, n.5, p.297-306, 2002.
- 9 BLAKE, G.M.; FOGELMAN, I. Bone densitometry, steroids and osteoporosis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.11, n.6, p.641-7, Nov. 2002.
- 10 BLANK, M.A. et al. Nonclinical model for assessing gastric effects of biphosphonates. **Dig Dis Sci**, v.42, n.2, p. 281-8, Feb.1997.
- 11 BODANE, C; BROWNSON, K. The growing acceptance of complementary and alternative medicine. **Health Care Manag**, v. 20, n.3, p.11-21, 2002.
- 12 BOONEN, S. et al. Safety and efficacy of risedronate in reducing fracture risk in osteoporotic woman aged 80 and older: implication for the use of antiresorptive agents in the old and oldest old. **J Am Geriat Soc**, v.52, n.11, p 1832-9, Nov. 2004.
- 13 BORAH, B. et al. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover. **Bone**, v.37, n.1, p.1-9, July 2005.

- 14 BOYD, H.W. **Introdução à medicina homeopática**. Trad. V.D. Barnabé. 2.ed. São Paulo: Ed. Santos, 1993. 285p.
- 15 BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.423, p.337-42, May 2003.
- 16 BRANDÃO, C.; HAUACHE, O.M. **Manual de doenças ósteo-metabólicas**. Cap.VI. Disponível em: <http://www.fleury.com.br>. Acesso em: 22 jul. 2005.
- 17 CAO, Y. et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v.17, n.12, p.2237-46, Dec. 2002.
- 18 CASTRO, L.F.; SILVA, A.T.A.; CHUNG, M.C. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Quim Nova**, v.27, n.3, p.456-60, 2004.
- 19 COMPSTON, J.E. The therapeutic use of biphosphonates. **Br Med J**, v.309, n.6956, p. 711-5, Sept. 1994.
- 20 COMPSTON, J.E. Sex steroids and bone. **Physiol Rev**, v.81, n.1, p.419-47, Jan. 2001.
- 21 CONSEJO GENERAL DE COLEJOS OFICIALES DE FARMACEUTICOS. **Panorama actual del medicamento**, v.24, n.239, 2000. Disponível em: <http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia>. Acesso em: 08 dez. 2004.

- 22 COOPER, C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. **Am J Med**, v.103, Suppl. 2A, p.12S-17S, Aug 1997 *apud* KOWALSKI, S.C.; SZEJNFELD, V.L.; FERRAZ, M.B. Utilização de recursos e custos em osteoporose. **Rev Assoc Med Bras**, v.47, n.4, p.352-7, out./dez. 2001.
- 23 CORNILLLOT, P. **Tratado de Homeopatia**. Trad. J. Wolf. Porto Alegre: Artmed, 2005. 616p.
- 24 CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. Similia similibus curentur: notação histórica da medicina homeopática. **Rev Ass Med Brasil**, v.43, n.4, p.346-51, 1997.
- 25 D'AOUST, P. et al. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. **Cell Tissue Res**, v.302, n.3, p.353-63, Dec. 2000.
- 26 DAI, X.-M. et al. Osteoclast deficiency results in disorganized matrix, reduced mineralization, and abnormal osteoblast behavior in developing bone. **J Bone Miner Res**, v.19, n.9, p.1441-51, Sept. 2004.
- 27 DANTAS, C.J.S. Reparação tecidual: aspectos celulares e moleculares. In: SIQUEIRA JÚNIOR., J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. Cap.16, p.173-255.
- 28 DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v.289, p.1501-4, Sept. 2000.

- 29 EASTELL, R. Drug therapy: treatment of postmenopausal osteoporosis. **N Engl J Med**, v. 338, n.11, p.736-46, Mar. 1998.
- 30 EGGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporos Int**, v.16, p.S129-S38, 2005.
- 31 FOGELMAN, I. et al. Risedronate reverses bone loss in postmenopausal women with low bone mass: results from a multinational, double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.5, p.1895-900, May 2000.
- 32 FUKUDA, S; IIDA, H. Age-related changes in mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats. **J Vet Med Sci**, v.66, n.7, p. 755-60, 2004.
- 33 GENANT, H.K. et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. **Osteoporos Int**, v.10, p.259-64, 1999.
- 34 GEORGE, M. et al. Metabolic activation stimulates acid secretion and expression of matrix degrading proteases in human osteoblasts. **Ann Rheum Dis**, v.63, p. 67-70, 2004.
- 35 GOSAIN, A.K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. **Plastic Reconstr Surg**, v.106, n.2, p.360-71, Aug. 2000.

- 36 GUEDES JÚNIOR, F.S. et al. **Osteoporose**. 2003. 17f. Monografia (obtenção de conceito na disciplina de ortopedia e traumatologia) Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, 2003. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/main.html>. Acesso em: 08 jul. 2004.
- 37 HAGUENAUER, D. et al. Anabolic agents to treat osteoporosis in older people: is there still place for fluoride? In: The Cochrane Library. **JAGS**, v.49, p.387–9, Oct. 2001.
- 38 HAM, A.W. Hueso. In:____. **Tratado de histologia**. Trad. A.F. Pi; S.S. Renard. 7.ed. México: Interamericana, 1975. Cap.15, p.352-417.
- 39 HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v.423, p.348-55, May 2003.
- 40 HARRIS, S.T. et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **J Am Med Assoc**, v.282, n.14, p.1344–52, Oct. 1999.
- 41 HIRABAYASHI, H.; FUJISAKI, J. Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents. **Clin Pharmacokinet**, v.42, n.15, p.1319-30, 2003.
- 42 IM, G.-I. et al. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, v.25, n.18, p.4205-15, Aug. 2004.

- 43 ITO, M et al. Effects of risedronate on trabecular microstructure and biomechanical properties in ovariectomized rat tibia. **Osteoporos Int**, v.16, n.9, p.1042-8, Sept. 2005.
- 44 JEE, W.S.S. Animals models in the prevention and treatment of osteopenia: forward. **Bone**, v.17, n.4, Suppl., p. 113S-4S, Oct. 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science>. Acesso em: 15 jun. 2004.
- 45 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.8, p.136-53.
- 46 KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v.15, p.175-92, 1991.
- 47 KANATSU, K. et al. Mucosal irritative and healing impairment action of risedronate in rat stomachs: comparison with alendronate. **J Gastroenterol Hepatol**, v.19, n.5, p. 512-20, May 2004.
- 48 KENT, J.T. **Materia medica homeopatica**: tomo I. Buenos Aires: Albatros, 1989. 593p.
- 49 KIMBLE, R.B. Alcohol, cytokines, and estrogen in the control of bone remodeling. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.3, p.385-91, 1997.
- 50 KOIVUKANGAS, A. et al. Long-term administration of clodronate does not prevent fracture healing in rats. **Clin Orthop Relat Res**, n.408, p.268-78, Mar. 2003.

- 51 KONG, Y.-Y.; PENNINGER, J.M. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. **Exp Gerontol**, v.35, p.947-56, 2000.
- 52 KOSSAK-ROMANACH A. **Homeopatia em 1000 conceitos**. São Paulo: ELCID, 1984. 607p.
- 53 KOWALSKI, S.C.; SZEJNFELD, V.L.; FERRAZ, M.B. Utilização de recursos e custos em osteoporose. **Rev Assoc Med Bras**, v.47, n.4, p.352-7, out./dez. 2001.
- 54 KRANE, S.M.; NEER, R.M. Tecido conjuntivo. In: SMITH JUNIOR, H.L.; THEIR, S.O. **Fisiopatologia**: os princípios biológicos da doença. Trad. I.C. Benedetti; F. Werebe. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1990. Cap.9, p.564-603.
- 55 LANE, J.M.; RILEY, E.H.; WIRGANOWICZ, P.Z. Osteoporosis: diagnosis and treatment. **J Bone Joint Surg**, v. 78-A, n.4, p.618-32, Apr. 1996.
- 56 LANGER, A.L. **Osteoporose**: conceito geral e importância nos quadros de miopatias. Disponível em: <http://www.distrofiamuscular.net/osteoporose.htm>. Acesso em: 02 jun. 2004.
- 57 LEDFORD, D. et al. Osteoporosis in the corticosteroid-treated patient with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.102, n.3, p.353-62, Sept. 1998.
- 58 LEU, C.-T. et al. Relative binding affinities of biphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. **Bone**, v.38,

n.5, p.628-36, May 2006. (No prelo). Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4Y-4H68NS8-1&_coverDate=05%2F31%2F2006&_alid=447617067&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=4987&_sort=d&view=c&_acct=C000049644&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972040&md5=c739d1bd19fbc14e11a525f89d788a0e. Acesso em: 01 abr 2006.

- 59 LI, C. et al. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. **J Bone Miner Res**, v.16, n.3, p.429-36, Mar. 2001.
- 60 LI, J. et al. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. **J Bone Miner Res**, v.14, n.6, p.969-79, June 1999.
- 61 MAEDA, S. et al. Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. **EMBO J**, v.23, n.3, p.552-63, 2004.
- 62 MANDUCA, P. et al. FMS Calciumfluor specifically increases mRNA levels and induces signaling via MAPK 42,44 and not FAK in differentiating rat osteoblasts. **Cell Biol Int**, v.29, p. 629-37, 2005.
- 63 MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the treatment of osteoporosis. **Endocr Rev**, v.21, n.2, p.115-37, Apr. 2000.

- 64 MARIE, P.J. The molecular genetics of bone formation: implications for therapeutic interventions in bone disorders. **Am J Pharmacogenomics**, v.1, n.3, p.175-87, 2001.
- 65 McCLUNG, M.R. et al. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly woman. **New Engl J Med**, v.344, n.5, p.333-40, Feb. 2001.
- 66 MUNDY, G.R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, v.24, n.5S, p.35S-8S, May 1999.
- 67 MUTHUSAMI, S. et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. **Clin Chim Acta**, v.360, n.1-2, p.81-6, 2005.
- 68 NAGASHIMA, M. et al. Biphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. **Bone**, v.36, n.3, p. 502-11, Mar. 2005.
- 69 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, Jan. 2001.
- 70 NANCOLLAS, G.H. et al. Novel insights into actions for biphosphonates on bone: differences in interactions with hidroxyapatite. **Bone**, v.38, n.5, p.617-27, May 2006. (No prelo).
Disponível em:
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4Y-4GNTFTY-2&_coverDate=05%2F31%2F2006&_alid=447615108&_rdoc=1&_fmt

=&_orig=search&_qd=1&_cdi=4987&_sort=d&view=c&_acct=C000049644&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972040&md5=6b8afb85a2e76e0afda2ed48099465f6. Acesso em: 01 abr. 2006.

- 71 NASSIF, M.R.G. **Compêndio de homeopatia**. São Paulo: Robe, 1995. 524p.
- 72 NATIONAL CENTER FOR COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE. **Questions and answers about homeopathy**. Disponível em: <http://nccam.nih.gov/health/homeopathy/>. Acesso em: 01 abr. 2006.
- 73 NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. Feb. 2004. Disponível em: <http://www.nof.org/osteoporosis/stats.htm>. Acesso em: 20 jun. 2004.
- 74 NETELENBOS, C. Osteoporosis: intervention options. **Maturitas**, v.30, n.3, p.235-9, Nov.1998.
- 75 NOÇÕES elementares de farmacotécnica homeopática. Rio de Janeiro: Revista Homeopática Similia, 1980. 36p.
- 76 PALERMO, C. et al. Osteogenesis *in vitro* in rat-derived osteoblasts is promoted by the homeopathic preparation FMS Calciumfluor. **Cell Biol Int**, v.23, n.1, p.31-40, 1999.
- 77 PARFITT, A.M. et al. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of biphosphonates. **J Bone Miner Res**, v. 11, n.2, p.150-9, Feb. 1996.

- 78 PATRÍCIO, F. **A homeopatia:** bases científicas. Disponível em: http://www.reckeweg.pt/circular/set_out_2003/set_out_2003.html. Acesso em: 25 mar. 2006.
- 79 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.207-12, Mar. 1997.
- 80 PRADO, F.A. et al. Determinação do tamanho crítico em defeitos ósseos em tíbias de ratos. In: REUNIÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2003, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: FOSJC, 2003.
- 81 RADOMINSKI, S.C. et al. **Osteoporose em mulheres na pós-menopausa**. São Paulo: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2002, (Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia e Sociedade Brasileira de Reumatologia, Projeto Diretrizes), 2002.
- 82 RANG, H.P. et al. Metabolismo ósseo. In:____. **Farmacologia**. Trad. P.L. Voeux, A.J.M.S. Moreira. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p.509-18.
- 83 RESNICK, D. et al. Histogenesis, anatomy, and physiology of bone. In: RESNICK, D. **Diagnosis of bone and joint disorders**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. Cap.20, p.609-51.
- 84 RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocr Rev**, v.23, n.3, p.279-302, 2002.

- 85 RISEDRONATE Sodium. **Am J Health Syst Pharm.** v.58, n.18, p.1706-7, Sept. 2001.
- 86 RIZZOLI, R.; BONJOUR, J.P. Determinants of peak bone mass and mechanism of bone loss. **Osteoporos Int**, v.9, Suppl.2, p.S17-23, 1999.
- 87 RODAN, G.A.; RESZKA, A.A. Osteoporosis and biphosphonates. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85-A, Suppl.3, p.8-12, 2003.
- 88 SAMPSON, H.W. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. **Alcohol Res Health**, v.26, n.4, p.292-8, 2002.
- 89 SCHEIDT-NAVE, C. et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.5, p.2032-42, 2001.
- 90 SCHENK, R.K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. Trad. P.B. de Moraes; J. Scarso Filho. São Paulo: Quintessence, 1996. Cap.3, p. 49-100.
- 91 SCHOEN, A.M.; WYNN, S.G. **Complementary and alternative veterinary medicine: principles and practice**. St. Louis: Mosby, 1998. 820p.
- 92 SCHULZE, R.K.W.; D'HOEDT, B. A method to calculate angular disparities between object and receptor in paralleling technique. **Dentomaxillofac Radiol**, v.31, n.1, p.32-8, Jan. 2002.

- 93 SENRA, G.S. Estudo radiográfico do reparo ósseo em ratos SHR com osteoporose utilizando homeopatia e risedronato. In: MOSTRA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ, 5, 2004, Taubaté. **Resumo...** V Mostra de Pós-graduação da Universidade de Taubaté. Taubaté, 2004. p.306.
- 94 SHARMA, R.R. Homeopathy today: a scientific appraisal. **Br Homeopath J**, v.75, p.231-6, Oct. 1986 *apud* ULLMAN, D. **Homeopatia: medicina para o século XXI**. Trad. C. Youssef. São Paulo: Cultrix, 1988. 344p.
- 95 SILVEIRA, V.A.S. Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal com estrógeno e da associação de ambos na reparação de defeitos ósseos em ratas ovariectomizadas. 2004. 140f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2004.
- 96 SIMON, A.M.; MANIGRASSO, M.B.; O`CONNOR, J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. **J Bone Miner Res**, v.17, n.6, p.963-76, June 2002.
- 97 SIMS, N.A. et al. Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovariectomized rat. **Calcif Tissue Int**, v.59, n.2, p. 121-7, 1996.
- 98 STEPAN, J.J. et al. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. **Endocr Regul**, v.37, n.4, p. 225-38, Dec.2003.

- 99 STEPENSKY, D.; KLEINBERG, L.; HOFFMAN, A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. **Clin Pharmacokinet**, v.42, n.10, p.836-81, 2003.
- 100 SUDA, T. et al. Regulation of osteoclast function. **J Bone Miner Res**, v.12, n.6, p.869-79, June 1997.
- 101 SUH, T.T.; LYLES, K.W. Osteoporosis considerations in the frail elderly. **Curr Opin Rheumatol**, v.15, n.4, p.481-6, July 2003.
- 102 SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000. 406p.
- 103 TEIXEIRA, M.Z. **Distúrbios do climatério** (menopausa). Disponível em: http://www.homeozulian.med.br/int_geral7.htm. Acesso em: 21 jan. 2006.
- 104 TETAU, M. **Matéria médica homeopática clínica e associações bioterápicas**. Trad. Z.B. Antony. São Paulo: Andrei, 1987. 238p.
- 105 THOMPSON, D.D. et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.17, n.4, p.125S-33S, Oct. 1995.
- 106 TIVESTEN, A. et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v.19, n.11, p. 1833-9, 2004.
- 107 TROWBRIDGE, H.O.; EMLING, R.C. Regeneração e cicatrização. In:__. **Inflamação: uma revisão do processo**. 4.ed. São Paulo: Quintessence, 1996. Cap.4, p.146-7.

- 108 TURNER, A.S. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. **Eur Cell Mater**, v.1, n.1, p.66-81, 2001.
- 109 TURNER, R.T. et al. Animal model for osteoporosis. **Rev Endocr Metab Disord**, v.2, p.117-27, 2001.
- 110 TURNER, R.T.; SIBONGA, J.D. Effects of alcohol use and estrogen on bone. **Alcohol Res Health**, v.5, n.4, p.276-81, 2001. Disponível em: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh25-4/276-281.htm>. Acesso em: 5 maio 2006.
- 111 UDAGAWA, N. et al. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. **J Exp Med**, v.182, p.1461-8, Nov. 1995.
- 112 ULLMAN, D. **Homeopatia: medicina para o século XXI**. Trad. C. Youssef. São Paulo: Cultrix, 1988. 344p.
- 113 VIJNOVSKY, B. Calcarea fluorica (fluoruro de calcio). In: __. **Tratado de materia medica homeopatica**: em três tomos. Buenos Aires: Rumo Gráfica, 1992, p.326-8.
- 114 VON KNOCH, F. et al. Effects of biphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v.26, n.34, p.6941-9, Dec. 2005.
- 115 WAGNER, S. et al. Diagnosis of osteoporosis: visual assessment on conventional versus digital radiographs. **Osteoporos Int**, v.16, n.12, p.1815-22, Dec. 2005.

- 116 WALSH, W.R. et al. Fracture healing in a rat osteopenia model. **Clin Orthop Relat Res**, n.342, p.218-27, Sept. 1997.
- 117 WERKMAN, C. **Estudo comparativo dos efeitos de risedronato e da *Calcareo phosphorica* 6CH na reparação óssea em tíbias de ratos machos castrados**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.
- 118 WOO, T.; ADACHI, J.D. Role of biphosphonates and calcitonin in the prevention and treatment of osteoporosis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v.15, n. 3, p. 469-81, July 2001.
- 119 WRONSKI, T.J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcif Tissue Int**, v.45, n.6, p.360-6, Dec.1989.
- 120 ZAIDI, M. et al. Understanding osteoclast formation and function: implications for future therapies for osteoporosis. **Curr Opin Orthop**, v.14, p.341-50, 2003. Disponível em: <http://www.co-orthopedics.com/pt/re/coortho/toc.00001433-200310000-00000.htm>. Acesso em: 5 maio 2006.

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA <small>Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - São José dos Campos - CEP 12241-900 - F. (12) 3947-9000 - FAX (12) 3947-9028 -</small>	
 Comitê de Ética em Pesquisa-Local	
São José dos Campos, 17 de agosto de 2006	
Ofício nº 071/06-CEP	
Prezado(a) Sr.(a)	GISELLE SEGNINI SENRA
Projeto	Estudo comparativo de reparação óssea em ratos ovariectomizado tratados com risedronato e medicamento homeopático
PARECER	
Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a ALTERAÇÃO DO TÍTULO , passando para "Estudo comparativo de reparação óssea em ratos ovariectomizadas tratadas com risedronato e Calcarea fluorica". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 025/2003-PH/CEP de 14/10/2003.	
Atenciosamente,  Prof. Dra. SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI Coordenadora do CEP/FOSJC	

SENRA, G.S. **Comparative study of bone repair in ovariectomized rats treated with risedronate and *Calcarea fluorica***. 2006. 149f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

ABSTRACT

The increase in life expectancy is associated with a higher incidence of degenerative diseases such as osteopenia and osteoporosis, which elevate the occurrence of bone fractures, and demand long treatment. The medication used to treat osteoporosis can interfere with bone fractures repair. The aim of this work was evaluating the effects of Risedronate (1,5mg/Kg/day) and of the homeopathic medicine Calcareo fluorica 6CH (3 drops/day) on bone repair in rats with induced osteopenia. For that, 105 rats were ovariectomized and 35 were sham operated. After 35 days, 2,5 mm monocortical bone lesions were drilled on all animals tibiae. Then, treatment began. The ovariectomized animals were divided in three groups, one received Risedronate (R), the other Calcareo fluorica (Cf), and the third one (O) as well as the Sham group (S) received distilled water as a placebo. The animals were sacrificed at three, six, 12, 18 and 24 days after the beginning of treatment. Their tibiae were removed, radiographed, decalcified and processed for morphological analysis. Data were submitted to ANOVA and Tukey (5%) tests. According to optical density analysis, there were no differences between treatments at three, six and 12 days, but at 18 and 24 days, group R showed the highest values ($p < 0,05$). Histomorphometric analysis evaluated the filling percentage by newly formed bone within the total area available in the defect and medullar cavity together; and also the percentage of trabecular bone within the callus. According to the first measure, the group R showed the highest values in all periods, surpassing all the groups ($p < 0,05$) while the groups Cf and O showed similar results in all periods, except on day 6, when group Cf was higher. The measure of the trabecular area in the callus showed no difference between the groups R, Cf and O on the 6th, 12th and 18th days. On the 24th day, group O showed the higher trabecular value and group R showed the lower value. It was possible to conclude that ovariectomy has interfered negatively on the bone repair process and that Risedronate stimulated a great amount of bone formation with low bone turn over. Calcareo fluorica 6CH stimulated high bone formation at the initial stages of bone repair when compared to the control group but didn't inhibit bone remodeling.

KEYWORDS: *Allopathy; homeopathy; Calcareo fluorica 6CH; diphosphonates; bone regeneration; osteoporosis; rats; radiography, dental, digital; histomorphometry.*

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.

São José dos Campos, 17 de julho de 2006.

CD GISELLE SEGNINI SENRA