

EVANDRO PEREIRA PALACIO

**EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE O PROCESSO DE
REMODELAÇÃO ÓSSEA EM RATAS OOFORECTOMIZADAS. ESTUDO
CLÍNICO, DENSITOMÉTRICO, BIOMECÂNICO E MICROTOMOGRÁFICO**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Botucatu, Universidade Estadual Paulista
– Unesp, para obtenção do título de Doutor
em Bases Gerais da Cirurgia.**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÉRIKA VERUSKA PAIVA ORTOLAN

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO SWAIN MULLER

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SELMA MARIA DE JESUS*

Palacio, Evandro Pereira.

Efeitos do ácido zoledrônico sobre o processo de remodelação óssea em ratas ooforectomizadas : estudo clínico, densitométrico, biomecânico e microtomográfico / Evandro Pereira Palacio. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Érika Veruska Paiva Ortolan

Co-Orientador: Sérgio Swain Müller

Capes: 40101186

1. Osteoporose – Estudos experimentais 2. Menopausa.

Palavras-chave: Ácido zoledrônico; Menopausa; Ooforectomia; Osteoporose; Rato.

Dedicatória

Ao Senhor Jesus Cristo,

*Que um dia, lá da eternidade, sonhou e desejou, em Seu coração,
dar-me forma e vida;*

À minha família,

*pelo apoio, compreensão, paciência e incentivo para que eu pudesse
seguir com meus sonhos;*

À Ana Lúcia,

eternamente amada.

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Érika Veruska Paiva Ortolan

Fui apresentado à Profa. Érika em meio a uma situação bastante difícil e desanimadora de meu período de doutoramento.

Felizmente, Deus não dormita. Ele sempre coloca, em nossos caminhos, as pessoas certas, nas horas certas!

Professora, muitíssimo obrigado por seu apoio, paciência e desprendimento. Obrigado, principalmente, por ter me dado ânimo e por me mostrar que sempre há um caminho, uma saída, uma opção.

Serei sempre grato pelo auxílio e ensinamentos durante a fase mais importante de minha pesquisa.

Verdadeiramente, sinto-me um privilegiado por tê-la tido como minha orientadora.

Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Sérgio Swain Muller

*O Prof. Sérgio me ensinou não apenas sobre osteoporose,
biomecânica óssea e modelos experimentais.*

Com ele aprendi o verdadeiro sentido de “fazer ciência”.

*Aprendi ser possível ensinar de forma positiva e despretensiosa, ser
amigo sem perder a autoridade e a ter paixão pela docência mesmo
estando extremamente atarefado.*

*Carregarei sempre comigo seus ensinamentos. Pretendo seguir seu
exemplo e me tornar um profissional à altura do que ele foi para
mim, durante o período de meu doutoramento.*

*Professor Sérgio, por tudo que passamos nestes anos de convívio,
ficam minha gratidão e afeto.*

Muito obrigado!

*“Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho,
tudo o que sou e o que vier a ser,
vem de Ti, Senhor”*

(Diante do Trono, 2002)

Agradecimentos

Pelos caminhos que percorri sempre encontrei pessoas dispostas a me ajudar, entusiástica e despretensiosamente. Meus mais sinceros agradecimentos aos que contribuíram para minha formação e elaboração deste trabalho:

Ao Dr. Antônio Carlos Pereira Cunha Castro (“Tonhão”), pelo auxílio na avaliação densitométrica e a permissão de uso do “Centro de Diagnostico por Imagem” (CDI) do Hospital Estadual (Bauru – SP);

Ao Professor Titular, Dr. Carlos Padovani, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu (UNESP), por sua inestimável ajuda e profissionalismo;

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), em especial a Sra. Maria Helena Spadot de Lima, Sr. Luís Carlos Bardella e Sra. Luzia Ferrari Galvea, pela prontidão de seus serviços, simpatia no atendimento e cuidados com os animais;

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), em especial à Simone Barroso Corvino Camargo, Luana Ferreira Amaral e Solange Aparecida de Albuquerque Clara, pelo auxílio de todas as horas e por sempre me atenderem com simpatia, presteza e gentileza;

À equipe Técnica da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP): Sra. Janete A. H. Nunes Silva, Sra. Regina Célia Spadin, Sr. Nathanael Pinheiro Salles e Sra. Lílian Cristina N. B. Nunes, que sempre me atenderam com um sorriso e boa vontade, tornando, minha vida, durante a pós-graduação, muito mais fácil;

À Sra. Enilze de Souza Nogueira Volpato, Diretora da Biblioteca do Campus de Botucatu (UNESP), e as bibliotecárias Srta. Luciana Pizzani e Sra. Nivaldete Costa Fernandes Cruz (“Niva”), pelo auxílio na revisão bibliográfica;

Às secretárias da Diretoria da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Srta. Marli Aparecida Alves Scarminio e Srta. Ivani de Souza Ribeiro, pela graciosidade e gentileza com que sempre me atenderam;

Ao amigo, Prof. Dr. Roberto Ryuiti Mizobuchi, Chefe da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), pelo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional;

Aos amigos, Prof. Dr. José Antônio Galbiatti, Prof. Dr. Décio Cerqueira de Moraes Filho e Prof. Dr. Alcides Durigam Junior, pelos inestimáveis conselhos, bem como, pelo suporte intelectual e emocional que me proporcionaram;

A todos os amigos da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), pelo apoio e por, durante minhas ausências, terem cuidado de meus pacientes;

Aos amigos, ex-residentes, do Programa de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Dr. Fernando Roberto A. Pereira, Dr. Eduardo Martinelli Jacob, Dr. Thiago Balthazar Campi, Dr. Thiago Cesar Reis Olímpio e Dr. Ricardo Cesar Dutra, pela amizade e auxílio nas dissecações;

Aos meus alunos da graduação médica e residentes da Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA) que, tantas vezes, abriram mão de minha presença, para que eu pudesse completar as exigências de minha pós-graduação.

“Pelos livros que havia lido e pelas conversações que tive com os sábios que frequentavam a casa do prelado, soube que navegando, para além do oceano, se viam coisas maravilhosas.

Assim, me determinei assegurar, por meus próprios olhos, a veracidade de tudo o que contavam, para, por minha vez, poder contar a outros minhas viagens, tanto para entretê-los e ser-lhes útil, como para tornar-me um homem que passasse para a posteridade”.

Antonio Pigafetta (navegador e escritor italiano que participou e relatou a primeira viagem conhecida, realizada por europeus, ao redor do mundo).

Resumo

Com o objetivo de se investigar as repercussões clínicas, densitométricas, biomecânicas e microtomográficas do ácido zoledrônico sobre o tecido ósseo de ratas osteoporóticas, após menopausa induzida por ooforectomia bilateral, foram estudadas, prospectivamente, 80 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultas e virgens. Com trinta dias de vida, os animais foram aleatorizados, pelo método de sorteio de envelopes opacos e lacrados, em dois grupos, segundo o tipo de procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: grupo O (ooforectomia bilateral) (n=40) e grupo S (cirurgia *sham*) (n=40). No 30º dia de pós-operatório, os animais foram novamente sorteados e divididos em quatro subgrupos, de acordo com a administração, intraperitoneal, de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico ou água destilada, totalizando os quatro grupos de estudo: grupo OAZ (ooforectomizado com ácido zoledrônico) (n=20), grupo OAD (ooforectomizado com água destilada) (n=20), grupo SAZ (cirurgia *sham* com ácido zoledrônico) (n=20) e grupo SAD (cirurgia *sham* com água destilada) (n=20). Todos os animais foram mensalmente pesados ao longo do experimento. A eutanásia ocorreu com dose letal de pentobarbital sódico 3% (80 mg/kg), intraperitonealmente, em dois momentos, após a administração das substâncias: nove meses (Momento 1) e 12 meses (Momento 2). Para a análise do peso, foi considerada a sua curva evolutiva ao longo de todo o experimento. Os fêmures direitos foram utilizados para o estudo biomecânico, analisando-se as variáveis: carga máxima (N), limite de elasticidade (N) e coeficiente de rigidez (N/mm). Os fêmures esquerdos foram utilizados para o estudo densitométrico (mmAl) e para o estudo microtomográfico, analisando-se o volume ósseo (mm³), o número de trabéculas (mm⁻³), o diâmetro das trabéculas

(mm) e a distância intertrabecular (mm). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variâncias e complementada com testes de comparações múltiplas, em um esquema fatorial 2 x 2 x 2 (duas substâncias, dois tipos de procedimentos cirúrgicos e dois momentos de eutanásia). Utilizou-se o modelo inteiramente casualizado e o nível de significância de 95%. Pela análise dos resultados, concluiu-se que o ácido zoledrônico não teve influência no peso dos animais. Em se tratando do estudo biomecânico, o ácido zoledrônico aumentou, significativamente, a carga máxima e o limite de elasticidade, diminuindo o coeficiente de rigidez das peças anatômicas. Com relação à análise densitométrica, o ácido zoledrônico aumentou, significativamente, a densidade óssea dos fêmures. Na avaliação microtomográfica, o ácido zoledrônico aumentou, significativamente, o volume ósseo, o número de trabéculas e o diâmetro das mesmas, diminuindo a distância intertrabecular.

Descritores: Ácido zoledrônico; menopausa; ooforectomia; osteoporose; rato.

Abstract

The objective of this study was to prospectively investigate the clinical, densitometric, biomechanical and microtomographic effects of zoledronic acid in the femurs of 80 female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), with osteoporosis due to bilateral oophorectomy. With the age of thirty days, the animals were randomized into two groups, according to the surgical procedures: bilateral oophorectomy (group O) (n=40) and sham surgery (group S) (n=40). On the 30th postoperative day, the subjects were randomly divided into four groups, according to the intraperitoneal administration of 0.1 mg/kg of zoledronic acid or distilled water: group OAZ (ovariectomized group with zoledronic acid) (n=20), group OAD (ovariectomized group with distilled water) (n=20), group SAZ (sham group with zoledronic acid) (n=20) and group SAD (sham group with distilled water) (n=20). All animals were monthly weighted. The animals were euthanized with a lethal intraperitoneal dose of sodium pentobarbital 3% (80 mg/kg) after a follow up period of nine months (n=40) and 12 months (n=40). For the analysis of weight, it was considered the weight curve throughout the experiment. The right femurs were used for biomechanical tests, analyzing the maximum load (N), the yield point (N) and stiffness coefficient (N/mm). The left femurs were used for both, densitometric (mmAl) and microtomographic tests, getting the bone volume (mm³), the trabecular number (mm⁻³), the trabecular diameter (mm) and intertrabecular separation (mm). The statistical analysis was performed through the analysis of variances and complemented with the multiple averages comparison tests, for a 2 x 2 x 2 factorial project (two substances, two types of surgical procedures and two periods of euthanasia). It was used an entirely casual model, with a significance level of 95%. Through the results it was concluded

that the zoledronic acid had no influence on the weight of the animals. In the biomechanical evaluation, zoledronic acid significantly increased the maximum load and yield point, decreasing the stiffness coefficient of the bones. Concerning to the densitometric analysis, the zoledronic acid significantly increased the density of the femurs. Concerning to the microtomographic evaluation, zoledronic acid significantly increased the bone volume, the trabecular number and the trabecular width, reducing, in a significant way, the intertrabecular separation.

Key words: Zoledronic acid; menopause; oophorectomy; osteoporosis; rats.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

I. Osteoporose - Revisão de Literatura	16
I.1 Osteoporose	17
I.2 Osteoporose e o envelhecimento da população	22
I.3 Os custos da osteoporose	25
I.4 Osteoporose e os fármacos	28
I.5 Osteoporose e o ácido zoledrônico	34
Referências	38
II. Artigo Original 1	51
III. Artigo Original 2	76
IV. Artigo Original 3	101
V. Considerações Finais	127
VI. Anexos e Apêndices	131

I. Osteoporose – Revisão de Literatura

I.1 Osteoporose

Em abril de 1998, na cidade de Lund - Suécia, um comitê internacional, composto por 15 especialistas de diversas áreas da saúde e de diversas nacionalidades, reuniu-se para estabelecer as metas e os objetivos de um movimento global que, anos depois, seria chamado de *“The Bone and Joint Decade”* (A Década dos Ossos e Articulações). No ano 2000, a “Década dos Ossos e Articulações” foi formalmente inaugurada, na sede da Organização Mundial de Saúde (OMS), em Genebra - Suíça. Profissionais e especialistas de quase todos os países, inclusive o Brasil, com o apoio incondicional das Nações Unidas, comprometeram-se em trabalhar em uníssono, para melhorar a qualidade de vida de pessoas com problemas musculoesqueléticos (WOOLF, 1999). Esta campanha estendeu-se além dos 10 anos inicialmente propostos, e, atualmente, é composta por, aproximadamente, 60 países e mais de 760 sociedades e organizações médicas mundiais, dentre as quais, influentes representantes brasileiros, como o Conselho Federal de Medicina, a Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia e a Sociedade Brasileira de Reumatologia. Dentre todas as enfermidades musculoesqueléticas, a osteoporose foi eleita como o principal alvo de ação desta ação mundial, considerando-a como “a epidemia do século 21” (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001).

Contrariando o mito de que a osteoporose é uma doença recente, consequente aos hábitos deletérios da civilização moderna, estudos paleontológicos, ligados à patologia médica, demonstraram que esta não é, em absoluto, uma entidade clínica contemporânea. Provavelmente, um dos mais antigos casos

documentados sobre osteoporose, diz respeito a uma múmia egípcia do sexo feminino, datada da XII dinastia (1990 - 1786 a.C.), na qual pôde-se observar a presença de fraturas, do tipo acunhamento, nos corpos vertebrais torácicos (T₃ e T₈), além de fratura do colo femoral, todas associadas à intensa osteoporose, identificada nas radiografias e tomografias realizadas (DEQUEKER *et al.*, 1997). Recentemente, PERZIGIAN (2005), analisou a densidade mineral óssea (DMO) dos restos mortais de duas populações indígenas norte-americanas pré-históricas, os índios *Knoll* (2500 - 2000 a.C.) e os índios *Pete Klunk* (50 a.C. à 250 d.C.), ambas com hábitos e costumes alimentares inteiramente diferentes uns dos outros, descobrindo que a osteoporose estava presente, nas duas populações, em graus equivalentes aos encontrados nos dias atuais.

Dada a sua alta prevalência e importância, muitas e diferentes são as definições para osteoporose, contudo, pode-se observar, dentre as mesmas, a reprodução sistemática de alguns conceitos que traduzem a real gravidade da enfermidade. NGUYEN *et al.* (2000) definiram a osteoporose como um conjunto de consequências diretas do distúrbio da homeostase esquelética, que culminaria com a diminuição da força óssea e fraturas à mínimos traumas. O Departamento Norte-Americano de Saúde (NIH) ratifica o conceito de NGUYEN *et al.* (2000), definindo a enfermidade como uma desordem esquelética que apresenta, como características principais, o comprometimento da densidade e da qualidade do osso, o que predisporia ao maior risco de fraturas (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001). O Consenso Brasileiro de Osteoporose (PINTO NETO *et al.*, 2002) utiliza outros parâmetros para definir a doença, classificando a osteoporose como um distúrbio osteometabólico, caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea,

associada à deterioração de sua microarquitetura, culminando no aumento da fragilidade esquelética e riscos de fraturas. ROSEN *et al.* (2004) caracterizam a enfermidade considerando três pilares principais: a fragilidade do esqueleto, a diminuição da densidade mineral óssea e a alta morbidade que acompanha a moléstia. A micromorfologia do tecido ósseo foi objeto de especial atenção por GAMEIRO & SCHOTT (2006), que relataram a importância do conceito de alteração da arquitetura óssea, ou seja, a competência do osso estaria relacionada não apenas à quantidade de osso presente, mas, principalmente, ao arranjo espacial de suas trabéculas. Independentemente da definição utilizada, há que se dar o devido valor a dois conceitos de suma importância: quantidade e qualidade óssea.

A quantidade óssea, ou densidade mineral óssea (DMO), traduz, principalmente, a concentração de cálcio em sua composição. Esta é uma variável que pode ser avaliada pelos mais simples exames de imagens, tendo sido eleita, pela Organização Mundial de Saúde (1994), como o melhor parâmetro para a determinação da força e da resistência óssea. O exame de densitometria óssea (DXA) mostrou-se, à época, ser o de maior sensibilidade, sendo, até a atualidade, amplamente utilizado para o diagnóstico, tratamento e controle da osteoporose. Neste exame, a densidade mineral óssea, ou quantidade óssea, é estimada indiretamente, pela relação entre o total de gramas da parte mineral do tecido ósseo e a área ou volume do mesmo (g/cm^2); o diagnóstico de baixa concentração óssea, ou osteoporose, é confirmado quando a DMO está abaixo de 2,5 desvios-padrão (DP) da média do pico da massa óssea em adulto-jovens saudáveis do mesmo sexo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DENSITOMETRIA CLÍNICA, 2003).

A qualidade óssea caracteriza-se por ser um conceito mais abrangente que a quantidade óssea isoladamente. Esta é uma variável que engloba diferentes

características, intrínsecas ao tecido ósseo, que acabam por se interpolar e completar: a arquitetura óssea, ou seja, a morfologia das trabéculas que compõem o tecido, representadas pela quantidade, espessura e nível de conectividade entre as mesmas; o grau de remodelação do osso, ou *turnover*, que manifesta a taxa com que o mesmo é renovado, na proporção em que este é produzido e reabsorvido; os danos intrínsecos, ou microfraturas, que são a origem das macrofraturas, e, finalmente, o grau de mineralização, ou quantidade de osso, propriamente dito.

A osteoporose pode ser classificada em dois tipos: primária e secundária. Embora não haja registros exatos sobre a origem de tal divisão, são de ALBRIGHT *et al.* (1940, 1941) e de REIFENSTEIN & ALBRIGHT (1946), os primeiros artigos que, formalmente, classificam a osteoporose nestas duas classes. A osteoporose primária caracteriza-se por apresentar-se em sua forma “original”, ou seja, consequente a fatores inerentes ao processo de envelhecimento fisiológico humano, podendo ser subdivida em tipo I, a mais comum e causada pelo aumento da atividade osteoclástica, relacionada à deficiência de estrógenos, e sendo característica de mulheres na pós-menopausa; e tipo II, ou senil, relacionada ao envelhecimento natural do indivíduo, na qual a reabsorção óssea encontra-se ligeiramente aumentada, em detrimento da atividade osteoblástica diminuída (RIGGS & MELTON, 1986). A osteoporose secundária é, geralmente, consequente à outras enfermidades primárias ou à fatores externos, como o uso prolongado de algumas medicações, como os glicocorticoides, alterações físicas, como ocorre no hipogonadismo, e várias doenças (*diabetes mellitus*, doença celíaca, hipertireoidismo, tumores da medula óssea, hiperparatireoidismo, etc.) (GUARNIERO & OLIVEIRA, 2004). Outras condições como o tabagismo e o alcoolismo podem aumentar, em até duas vezes, o risco de desenvolvimento da

enfermidade (LANE *et al.*, 2000). Hábitos alimentares, sequelas de doenças e/ou acidentes, principalmente os neurológicos, que mantêm os pacientes acamados por longos períodos, também podem culminar com o desenvolvimento da enfermidade em sua forma secundária (CARVALHO, 2006). Estudos recentes demonstram, inclusive, o aumento da incidência de osteoporose em indivíduos submetidos à privação do sono (VGONTZAS *et al.*, 1999, 2004), bem como, à procedimentos cirúrgicos bariátricos, como a gastroplastia (OLMOS *et al.*, 2008; WUCHER *et al.*, 2008).

Em nossos dias, a osteoporose é classificada como uma pandemia, tamanha a sua incidência e prevalência nas mais variadas populações e países. Dados de 1991 estimavam que dentre as populações dos Estados Unidos, Europa e Japão, cerca de 75 milhões de pessoas estivessem afetadas, em diferentes graus, pela osteoporose (MEIRIK & ROWE, 1998; BORAH *et al.*, 2001). Dez anos depois, somente nos Estados Unidos, 20 milhões de pessoas tinham o diagnóstico confirmado de osteoporose, e 18 milhões o de osteopenia (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001). Em se tratando da incidência e prevalência da osteoporose em uma determinada população, CUMMINGS & MELTON (2002), sugerem que a maneira mais plausível de se determinar tais indicadores, é pela medição das taxas de fraturas proximais do fêmur, em indivíduos acima de 60 anos de idade.

De fato, é consenso que ocorrem, anualmente, em nível mundial, aproximadamente, 2,66 milhões de fraturas patológicas na região do quadril, devido à osteoporose, e que, até o ano 2050, este número quadruplique (OMS, 2003). As vítimas mais frequentes são, principalmente, as mulheres brancas, na pós-menopausa: estas sofrem quase $\frac{3}{4}$ de todas as fraturas na região do quadril,

secundárias à osteoporose (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001). Certamente, muitas destas fraturas patológicas, ligadas à raça e à idade, podem ser explicadas pela variação inferior da DMO (PEIXOTO & ROCHA, 2001; GAMEIRO & SCHOTT, 2006), contudo, outros fatores, como alterações na geometria óssea do fêmur proximal e pelve (PINHEIRO *et al.*, 1999; CANTO *et al.*, 2003; GIORDANO *et al.*, 2007), quedas frequentes (SOUZA & IGLESIAS, 2002; COUTINHO & SILVA, 2002; FABRÍCIO *et al.*, 2004; SADIGH *et al.*, 2004) e fatores genéticos (HOFBAUER *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2000; COXON *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2005), fazem parte desta casuística.

Não se pode negar, pois, que a osteoporose seja um problema de saúde pública mundial.

I.2 Osteoporose e o envelhecimento da população

A expectativa de vida está diretamente relacionada à qualidade da mesma. Em se tratando de osteoporose, o aumento da longevidade das populações é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da enfermidade. O avanço cultural, socioeconômico e tecnológico, que muitos países experimentam atualmente, terão consequências diretas sobre diferentes aspectos de saúde pública dos mesmos.

No Brasil, de acordo com o censo demográfico do ano 2000, a população brasileira ultrapassou, em janeiro de 2004, 180 milhões de habitantes (IBGE, 2004a), com o aumento, significativo e proporcional, da população idosa. O envelhecimento da população brasileira pode ser identificado, de maneira

contundente, pelos dados da Divisão de Estudos e Análise Demográfica (IBGE, 2000): no ano 2000, o Brasil possuía uma população acima de 80 anos de, aproximadamente, 1,1 milhões de habitantes; as projeções para o ano 2050 são de que, em apenas 50 anos, haja um aumento real de 713,5% da mesma, ou seja, uma população acima de 80 anos de, aproximadamente, oito milhões de pessoas, sendo que, 68,3% deste total, serão formados pelo sexo feminino. O próprio IBGE realizou, em 2004, a revisão e a atualização destas projeções, expressando dados ainda mais preocupantes: a população acima de 80 anos, em comparação com a do ano 2000, terá, em 2050, um aumento de, aproximadamente, 860%, atingindo números em torno de 13,7 milhões de pessoas (IBGE, 2004b) (figura 1).

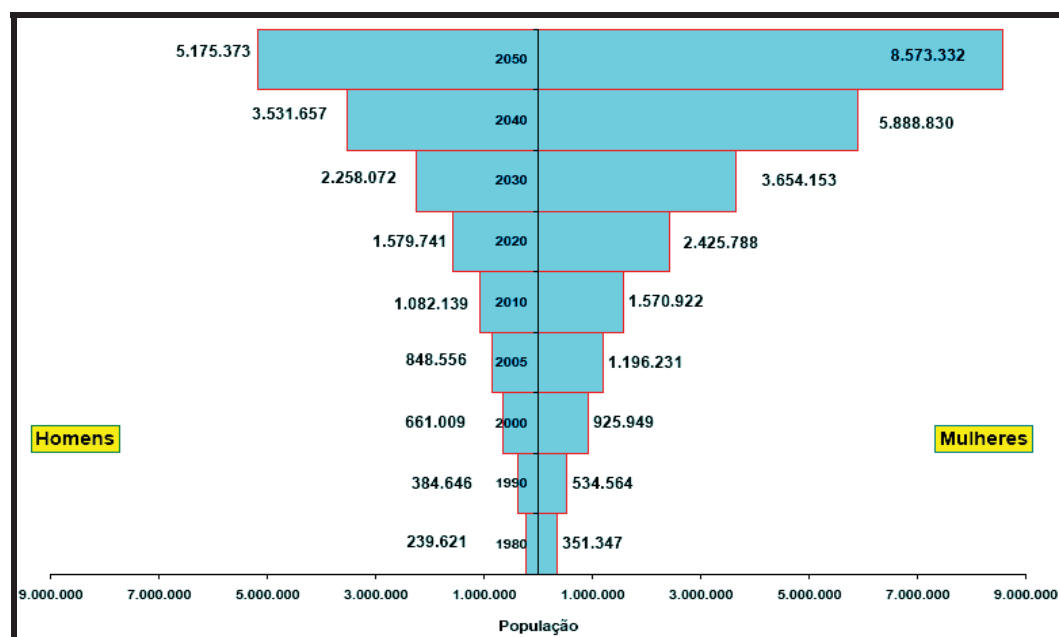


Figura 1 - Evolução da população acima de 80 anos, por idade e sexo, no Brasil, com projeção para 2050 (Fonte: IBGE/DPE/COPIS 2004).

Estima-se que, na população feminina, o declínio hormonal, característico do climatério, seja iniciado a partir dos 50 anos de idade (REBAR, 1997). Assim,

comparando-se a pirâmide etária de 1980 (figura 2) à projetada para o ano 2050 (IBGE, 2004b) (figura 3), o envelhecimento da população torna-se ainda mais evidente: a pirâmide etária do ano 1980 apresenta base alargada, pico baixo e estreito, forma típica dos países com altas taxas de natalidade, porém, pequena expectativa de vida e altas taxas de mortalidade em indivíduos idosos; em contrapartida, a pirâmide etária projetada, relativa ao ano 2050, manifesta informações referentes a um país com taxas de natalidade e mortalidade de idosos em franco declínio, identificadas, respectivamente, pela base estreita e topo alargado, além de um discreto, porém visível, aumento da expectativa de vida, representado pelo aumento da altura da pirâmide.

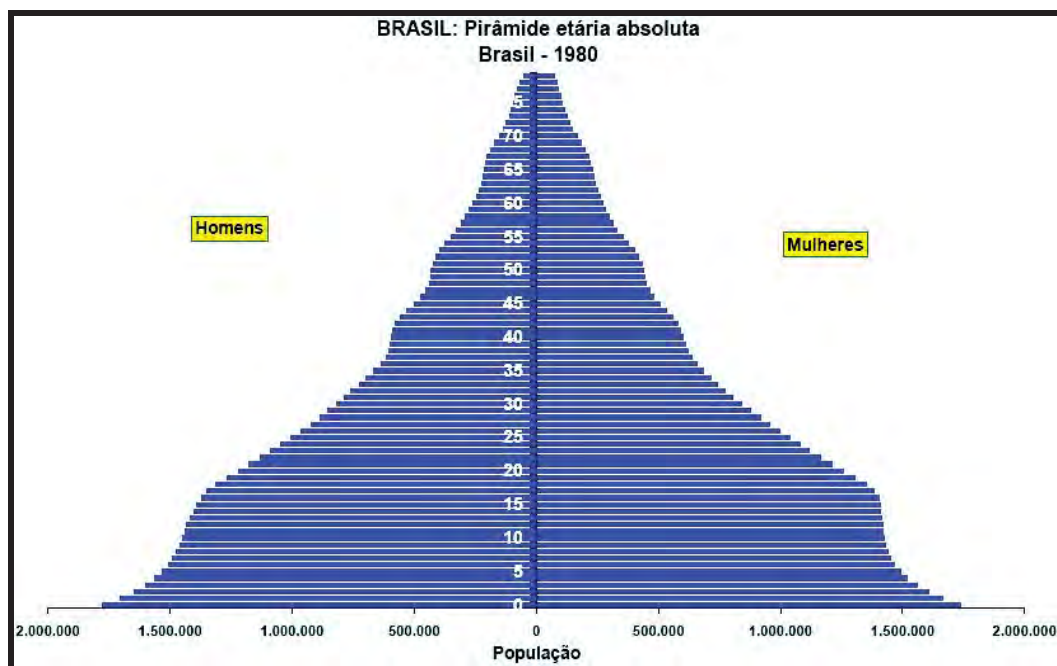


Figura 2 - Pirâmide etária absoluta do Brasil do ano 1980 (Fonte: IBGE/DPE/COPIS, 2004).

Faz-se importante salientar que, em apenas 70 anos (1980 a 2050), a população total brasileira, homens e mulheres, acima de 50 anos de idade, terá um

aumento absoluto de 550%; no mesmo período, em se tratando apenas da população feminina, este aumento será de 595,2% (IBGE, 2004b), ou seja, em 2050, teremos 45.027.859 mulheres acima de 50 anos de idade, 20% de toda a população brasileira. Dados ainda mais expressivos são projetados pela OMS acerca da expectativa de vida para a população brasileira, nascida em 2004: 67 anos para homens e 74 anos para mulheres (OMS, 2006). Considerando-se que a menopausa tenha seu início, nas mulheres brasileiras, por volta dos 50 anos de idade, teremos, no ano de 2078, mais de 45 milhões de mulheres em pleno período pós-menopáusico, mais de 36,5% de toda a população feminina brasileira, propensas a apresentar qualquer uma das complicações decorrentes da osteoporose, principalmente fraturas (IBGE, 2000).

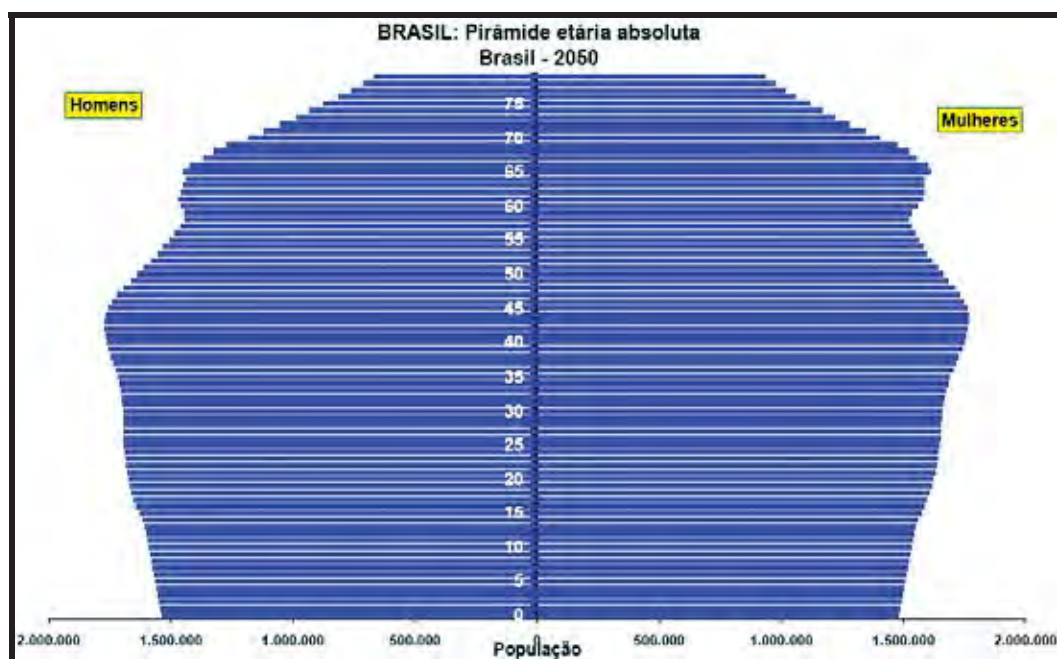


Figura 3 - Pirâmide etária absoluta do Brasil projetada para o ano 2050

(Fonte: IBGE/DPE/COPIS, 2004).

I.3 Os custos da osteoporose

As fraturas patológicas por osteoporose, de uma maneira geral, deveriam se constituir em objeto de apreensão pelos Estados, bem como, de profundos estudos, não somente devido aos altos custos, hospitalares e domiciliares, decorrentes do tratamento das mesmas, mas, principalmente, às altas taxas de morbidade e mortalidade a que estão associadas. COOPER *et al.* (1993) estimam que, para o ano 2050, a Ásia, a África e a América Latina serão sede de mais de 70% de todas as fraturas proximais femorais, devido à osteoporose, em nível mundial. Informações prestadas pela Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS) expressam que, somente nos Estados Unidos, em 1999, ocorreram, aproximadamente, 320 mil hospitalizações por fraturas osteoporóticas na região do quadril, a um custo anual de 12,6 bilhões de dólares. Levando-se em consideração o aumento global da expectativa de vida naquele país, espera-se que o número anual de fraturas do fêmur proximal atinja níveis próximos de 650 mil até o ano 2050, gerando, proporcionalmente, vultosos gastos de 25,6 bilhões de dólares (AAOS, 2001). Somam-se a estes valores, as consequências e sequelas diretas das mesmas.

As fraturas patológicas do fêmur proximal, por osteoporose, são as que apresentam pior prognóstico. KIEL *et al.* (1987) e KANIS & McCLOSKEY (1996) afirmam que dentre todos os pacientes que sofrem fratura da região proximal do fêmur, 20% terão uma sobrevida de até um ano e outros 50% não voltarão a andar de maneira autônoma, necessitando de cuidados domiciliares permanentes. Não há, no Brasil, indicadores atuais referentes aos números destas fraturas. Alguns autores, contudo, fornecem dados isolados de algumas regiões do país, que não representam, em absoluto, a realidade vivida pela nação. KOMATSU *et al.* (1999) analisaram a incidência de fraturas femorais no idoso, em uma determinada região

do interior do estado de São Paulo, relatando que a incidência de fraturas proximais do fêmur foi, significativamente, maior em pacientes com 60 anos ou mais. Resultados semelhantes foram encontrados por CASTRO & RIBEIRO (2003), na cidade de Sobral – Ceará, e por SILVEIRA *et al.* (2005), na cidade de Fortaleza – Ceará. Não existem, tampouco, no Brasil, dados atuais sobre o custo real decorrentes das internações e tratamentos destas fraturas. O Núcleo de Informações do Ministério da Saúde, por ocasião da “Campanha Nacional de Prevenção da Osteoporose”, em 2001, disponibilizou os dados referentes aos números de fraturas de quadril, do ano de 1988, bem como os custos do tratamento hospitalar das mesmas, relacionando-os com as cinco regiões do país, em pacientes acima de 60 anos de idade (MARQUES NETO, 2001) (tabela 1).

Tabela 1 - Total de fraturas do fêmur proximal e de seus custos, em indivíduos acima de 60 anos, no Brasil em 1988.

	Região Sudeste	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro- Oeste	Região Sul	Total
Total de fraturas	9.709	514	1.756	3.824	3.184	18.987
Custos (R\$)	10.920.464,73	1.042.684,03	1.543.384,32	4.496.308,85	9.392.820,62	27.395.662,55

Fonte: Núcleo de Informações/Ministério da Saúde.

As informações acima, embora pertençam à década de 80, revelam dados preocupantes em relação ao futuro, em se tratando da qualidade de vida de indivíduos acima de 60 anos de idade no Brasil, bem como, não deixam dúvidas acerca dos altíssimos custos econômicos e, conseqüentemente, sociais, oriundos das fraturas osteoporóticas. Expressam também a premente necessidade de ações de saúde voltadas, exclusivamente, para a chamada “terceira idade”.

I.4 Osteoporose e os fármacos

A Medicina do século XXI apresenta um enfoque particularmente preventivo das enfermidades, dando-se maior importância à profilaxia das mesmas. Em se tratando da osteoporose, sabe-se que a “poupança óssea”, realizada durante a mocidade, é um dos fatores primordiais para instalação ou não da doença. Para tanto, anualmente, dezenas de estudos instituem diversos mecanismos para o combate e/ou reversão da enfermidade: exercícios físicos de todas as formas, tipos e intensidades; mudança de hábitos deletérios de vida, apregoando, desde várias horas de sono à alimentação macrobiótica; atividades relacionadas à Medicina alternativa, como acupuntura e ioga, entre outras (KREY, 1982; DHONUKSHERUTTEN *et al.*, 2005; PHOOSUWAN *et al.*, 2009; KRUCOFF *et al.*, 2010; LIN & PAN, 2010; KORPELAINEN *et al.*, 2010; HAMDY *et al.*, 2010; NAKAGI *et al.*, 2010; OU-YANG *et al.*, 2011). Não obstante o grande volume de informações disponíveis sobre o tema, muitas delas sem qualquer grau de evidência científica, é perfeitamente possível o planejamento de métodos profiláticos, associados, ou não, ao uso de fármacos, que proporcionem alguma qualidade de vida e o mínimo de segurança nas atividades diárias de pacientes osteoporóticos.

Embora a cura da osteoporose esteja longe de ser alcançada, existem, dezenas de opções farmacológicas que visam minimizar os danos causados pela instalação da enfermidade. Atualmente, consideram-se como drogas eficazes no tratamento da osteoporose, aquelas que, primariamente, reduzem os riscos de fraturas em estudos científicos controlados (LEITE, 1999; PINTO NETO *et al.*, 2002). Atualmente, existem várias classes farmacológicas disponíveis, para o tratamento da osteoporose, e os bisfosfonatos são seus principais representantes. Uma vez que a

osteoporose é caracterizada por altas taxas de remodelação tecidual, as drogas que agem diminuindo a reabsorção óssea (antirreabsortivos) e/ou aumentando a formação do mesmo (estimuladores da formação) devem ser alvo de estudos aprofundados (tabela 2).

Tabela 2 – Principais drogas de ação antirreabsortivas e estimuladoras de formação óssea.

Drogas antirreabsortivas	Drogas estimuladoras da formação óssea
Terapia de reposição hormonal	
Modeladores dos receptores de estrogênio (SERMs)	Hormônio da Paratireoide (PTH 1-34)
Calcitonina	Teriparatida
Cálcio e vitamina D	Fluoreto de Sódio
Bisfosfonatos (BF)	

Adaptado de Leite (1999).

A terapia de reposição hormonal (TRH) firma-se em sólidos alicerces, como opção para o tratamento e prevenção da osteoporose. Vários estudos, de curto e longo prazos, demonstram sua eficácia no aumento da DMO e na redução das taxas de fraturas patológicas por osteoporose (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001; PINTO NETO *et al.*, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DENSITOMETRIA CLÍNICA, 2003; GUARNIERO & OLIVEIRA, 2004). A OMS (OMS, 1994) e WIMALAWANSA (1995), através de estudos epidemiológicos, em usuárias da TRH, demonstraram a redução de até 50% das fraturas vertebrais e de até 25%

das fraturas não-vertebrais. Dados ainda mais animadores são descritos por GUARNIERO & OLIVEIRA (2004), que relatam a redução de 40% a 50% das fraturas patológicas de fêmur e de até 90% do risco de fraturas vertebrais.

Os modeladores de receptores de estrogênio (SERMs) têm como principal objetivo aumentar os efeitos benéficos dos estrogênios nos ossos, diminuindo os efeitos carcinogênicos dos mesmos na mama e no endométrio (ETTINGER *et al.*, 1999; NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001). O principal representante desta classe, o raloxifeno, foi capaz de prevenir e diminuir o risco de fraturas vertebrais em 40% a 55% em pacientes com osteoporose (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001; PINTO NETO *et al.*, 2002; CARVALHO, 2006).

A calcitonina é um hormônio secretado pelas células “C” parafoliculares da tireoide. A droga similar, na forma de calcitonina de salmão, foi a primeira inibidora osteoclástica a ser utilizada, diminuindo as taxas de remodelação óssea, contudo, seu alto custo financeiro, maior índice de efeitos adversos e menor efetividade, em relação a outras drogas de menor custo, tem-na colocado em segundo plano no tratamento da osteoporose (PINTO NETO *et al.*, 2002; GRIZ *et al.*, 2006a). A calcitonina apresenta eficácia comprovada, acima de 90%, nos casos de osteoporose transitória do quadril (DRUMOND *et al.*, 1999), contudo, são também relatados o desenvolvimento de reações, do tipo antígeno-anticorpo, em cerca de 60% dos pacientes (GRUER *et al.*, 1993; LEITE, 1999; GRIZ, 2006b).

A ingestão de cálcio e de vitamina D deve fazer parte de qualquer programa terapêutico para pacientes com diminuição da DMO e, principalmente, naqueles com potencial risco de fraturas patológicas. CARVALHO (2006), contudo,

alerta que, principalmente em pacientes idosos, a perfeita absorção de cálcio pelo intestino, só se faz na presença da vitamina D₃. Outros estudos demonstram que a ingestão simultânea de cálcio e vitamina D tem reduzido, significativamente, as taxas de fraturas na região do quadril e de outras fraturas não-vertebrais em idosos (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001; GAMEIRO & SCHOTT, 2006; SEIBEL, 2006).

O PTH 1-34, que apresenta em sua composição os 34 primeiros aminoácidos da molécula original do paratormônio humano, é considerado um análogo, de grande eficácia, da mesma. Dependendo da dose e da maneira como é utilizado, pode favorecer tanto a formação quanto a reabsorção óssea (PINTO NETO *et al.*, 2002). Sua principal indicação diz respeito a pacientes com osteoporose estabelecida, ou seja, aqueles com -2,5 DP ao exame densitométrico e que apresentem pelo menos uma fratura osteoporótica (GUARNIERO & OLIVEIRA, 2004).

A teriparatida, um derivado sintético do hormônio da paratireoide, é a única substância que consegue um real ganho de massa óssea, pela estimulação e formação de osteoblastos, quando administrada subcutaneamente por um período de um a dois anos (OLIVEIRA *et al.*, 2003; CARVALHO, 2006). Outros autores, contudo, relatam a necessidade de maiores estudos relacionados à utilização da teriparatida no tratamento da osteoporose, uma vez que seu mecanismo de ação e resultados ainda permanecem obscuros (GUARNIERO & OLIVEIRA, 2004; FERRARI & RIZZOLI, 2005).

O uso do fluoreto de sódio, no tratamento da osteoporose, aumenta a mineralização e a massa óssea às radiografias, por sua atuação direta sobre os osteoblastos, além de promover a diminuição da reabsorção óssea (GUARNIERO &

OLIVEIRA, 2004), contudo, não há dados suficientes que comprovem a diminuição dos índices de fraturas pelo seu uso crônico (CARVALHO, 2006, COMPSTON, 2006).

Os bisfosfonatos (BF) são uma classe de medicamentos, derivados do pirofosfato, largamente utilizados em enfermidades com altas taxas de remodelação óssea como a osteoporose, doença de Paget e tumores com metástases ósseas (LI *et al.*, 1999). Devido à sua alta afinidade pelo cálcio ósseo, estas substâncias agem especificamente no sistema esquelético, mais precisamente diminuindo a reabsorção óssea através, basicamente, de sua ação inibitória sobre o mecanismo osteoclástico (SEEDOR *et al.*, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1999; AMANAT *et al.* 2005). DUNFORD *et al.* (2001) relatam que os bisfosfonatos acumulam-se internamente nos osteoclastos, provocando alterações em seu citoesqueleto e a consequente apoptose dos mesmos. Este mecanismo também foi descrito por COXON *et al.* (2000).

Diferentes tipos de BF podem ser obtidos alterando-se a estrutura de suas cadeias laterais (R1 e R2), presas ao átomo de carbono central da estrutura P-C-P (fósforo-carbono-fósforo) (COXON, 2000) (figura 4). Pode-se dizer que existem duas classes de bisfosfonatos: aqueles que apresentam nitrogênio em suas cadeias laterais (aminobisfosfonatos) e os que não apresentam nitrogênio (GRIZ, 2006b; WALTER *et al.*, 2007) (tabela 3). Ainda segundo GRIZ (2006a), os aminobisfosfonatos são mais potentes, em termos terapêuticos, que os que não apresentam nitrogênio em sua molécula.

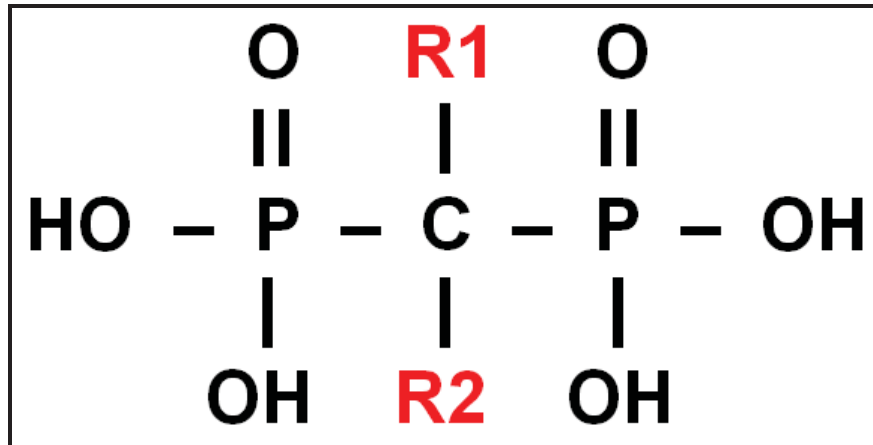


Figura 4 – Representação da estrutura molecular dos bisfosfonatos.

Tabela 3 - Bisfosfonatos com e sem nitrogênio em sua composição.

Bisfosfonatos com nitrogênio na cadeia lateral	Bisfosfonatos sem nitrogênio na cadeia lateral
Alendronato	Etidronato
Ibandronato	
Pamidronato	Tiludronato
Residronato	
Zoledronato	Clodronato

Fonte: Walter *et al.*, 2007.

Outros estudos demonstram que a potência terapêutica de um bisfosfonato está, também, relacionada a outros fatores, além da presença, ou não, de nitrogênio em sua molécula. Segundo SHINODA *et al.* (1983), a adição de um grupo hidroxila, ao átomo de carbono na posição lateral (R1) do bisfosfonato, aumentaria sua potência antirreabsortiva. Para FERNANDES *et al.* (2005), a presença de um grupo amino, no final da cadeia lateral (R2), dá ao BF potência

superior aos demais. Em verdade, a potência clínica destes fármacos está, diretamente, relacionada ao número de carbonos que faz parte da cadeia lateral R2: quanto mais átomos de carbono, maior a atividade antirreabsortiva da droga.

A maioria dos BF, de uso oral, tem efeitos bastante satisfatórios no tratamento de doenças com altos índices de remodelação óssea, contudo, seus efeitos adversos acabam por diminuir, em larga escala, a adesão dos pacientes a tais tratamentos. CRAMER *et al.* (2007) apresentam taxas de adesão dos pacientes, aos tratamentos com bisfosfonatos orais, que variam de 17,9% a 78%. Um dos principais efeitos adversos relatados, principalmente em relação àqueles de uso oral, é o desconforto gastrointestinal que provocam, geralmente associado à queixas de pirose intensa, diarreia, vômitos, cefaleia e obstipação (NEER *et al.*, 2001; ZEHNDER *et al.*, 2004); sintomas como os de gripe e edema periférico (ETTINGER *et al.*, 1999), além de efeitos mais graves como hepato-toxicidade, peritonite e óbito (YAMK *et al.*, 2007). A osteonecrose de mandíbula é um efeito adverso frequentemente relatado por diversos autores e, até o presente momento, sem elucidação quanto à sua fisiopatologia (ANGUITA *et al.*, 2006; SHANE *et al.*, 2006; SOMERMAN & McCAULEY, 2006; BILEZIKIAN, 2006).

I.5 Osteoporose e o ácido zoledrônico

Dentre os representantes da classe farmacêutica dos bisfosfonatos, o ácido zoledrônico, um novo aminobisfosfonato, tem se mostrado o mais potente inibidor da reabsorção óssea que qualquer outro (PATAKI *et al.*, 1997; CHEER & NOBLE, 2001; GLATT *et al.*, 2004). Um recente estudo, realizado em cães, sugere que o ácido zoledrônico não é apenas um potente agente antirreabsortivo, mas

também promove nova aposição óssea (WISE *et al.*, 2005). Quanto à sua potência, estudos demonstram uma efetividade, no mínimo, 100 vezes maior que o alendronato, o mais comum BF prescrito no Brasil, e até 10.000 vezes maior, se comparado ao etidronato (FERNANDES *et al.*, 2005) (tabela 4).

Tabela 4 - Principais bisfosfonatos e suas potências antirreabsortivas.

Bisfosfonato	Cadeia R1	Cadeia R2	Potência antirreabsortiva
Etidronato	OH	CH ₃	~ 1
Clodronato	Cl	Cl	~ 10
Pamidronato	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂	~ 100
Neridronato	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	~ 100
Alendronato	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	100 - 1000
Olpadronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	100 - 1000
Ibandronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃	1000 - 10.000
Risedronato	OH	CH ₂ -3-piridina	1000 - 10.000
Zoledronato	OH	CH ₂ -imidazol	> 10.000

Adaptado de FERNANDES *et al.* (2005).

Aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration* – USA) em 2001, o ácido zoledrônico foi, inicialmente, indicado para o tratamento da hipercalcemia maligna, causada por metástases tumorais ósseas (CHEN *et al.*, 2002; WENZEL *et al.*, 2004), contudo, verificou-se que sua ação estendia-se, também, às enfermidades relacionadas ao metabolismo ósseo. Estudos demonstram que, devido à sua alta potência, seu efeito antirreabsortivo máximo pode ser atingido com a administração de poucas doses, em intervalos de tempo maiores, comparativamente

aos demais bisfosfonatos (REID *et al.*, 2002; PERIFANIS *et al.* 2007). Os melhores resultados antirreabsortivos, com remissão quase total dos sinais e sintomas clínicos, além da normalização das alterações bioquímicas, têm sido encontrados no tratamento de doenças como o Paget (CHUNG & KEEN, 2003; REID *et al.*, 2005; GRIZ *et al.*, 2006a; GRIZ *et al.*, 2006b; MATOS *et al.*, 2007). Efeitos animadores também têm sido observados na terapêutica de sequelas ósseas de doenças como a talassemia (OTROCK *et al.*, 2006; GILFILLAN *et al.*, 2006; PERIFANIS *et al.*, 2007), lúpus eritematoso sistêmico (SOUZA *et al.*, 2004), doença de Erdheim-Chester (granulomatose lipídica) (SRIKULMONTREE *et al.*, 2007), entre outras. No campo da Ortopedia e Traumatologia, o ácido zoledrônico tem sido utilizado, com sucesso, no tratamento de pseudartroses e retardes de consolidação (MATOS *et al.*, 2007), osteonecrose asséptica da cabeça femoral (LITTLE *et al.*, 2003b), artrites (SIMS *et al.*, 2004), soltura asséptica de próteses de quadris e joelhos (WISE *et al.*, 2005), artrodeses (BRANSFORD *et al.*, 2007) e em perdas de seguimentos ósseos (LITTLE *et al.*, 2003a; LITTLE *et al.*, 2005). Outros autores também obtiveram bons resultados utilizando esta droga no tratamento da osteoporose causada pela imobilidade prolongada, como nos casos de lesões medulares (BINKLEY *et al.*, 1998; HORNBY *et al.*, 2003; SHAPIRO *et al.*, 2007), e aos diferentes tipos de falhas de implantes metálicos ortopédicos (PETER *et al.*, 2006).

A despeito de todos os estudos relacionados ao ácido zoledrônico, existe uma surpreendente carência de estudos que associam esta droga à osteoporose primária do tipo I. Esta lacuna torna-se ainda mais evidente, e preocupante, ao se verificar a quase inexistência de estudos experimentais de origem nacional, relativamente ao tema. Mesmo frente às mais sombrias previsões epidemiológicas, acerca do futuro desta enfermidade no Brasil, as diversas bases de dados

enumeram, apenas, quatro citações brasileiras relacionadas ao ácido zoledrônico e a osteoporose primária do tipo I (CARVAS, 2007; JANJACOMO, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009; PALACIO *et al.*, 2010).

Dessa maneira, propõe-se, com o presente estudo, a investigação dos efeitos do ácido zoledrônico sobre o peso de ratas osteoporóticas, após ooforectomia bilateral, e sobre a região proximal femoral das mesmas, sob o ponto de vista densitométrico, biomecânico e microtomográfico.

*Referências **

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html>
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003.

- AAOS – American Academy of Orthopaedic Surgeons. The hip. Preventing hip fractures [AAOS report]. AAOS 2001.
- Albright F, Bloomberg E, Smith PH. Postmenopausal osteoporosis. *Trans Assoc Am Physicians* 1940; 55: 298.
- Albright F, Smith PH, Richardson AM. Post-menopausal osteoporosis: its clinical features. *JAMA* 1941; 116: 2465.
- Amanat N, Brown R, Bilston LE, Little DG. 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* 2005; 23: 1029-34.
- Anguita T, Agurto J, Roa I, Laissle G. Osteonecrosis asociada al uso de bisfosfonatos: a propósito de un caso clínico. *Rev Méd Chile* 2006; 134(9): 1161-5.
- Bilezikian JP. Osteonecrosis of the jaw – do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med* 2006; 355(22): 2278-81.
- Binkley N, Kimmel D, Bruner J, Haffa A, Davidowitz B, Meng C *et al.* Zoledronate prevents the development of absolute osteopenia following ovariectomy in adult rhesus monkeys. *J Bone Miner Res* 1998; 13(11): 1775-82.
- Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, Smith TS, Cockman MD *et al.* Three-Dimensional Microimaging (MRml and mCT), Finite Element Modeling, and Rapid Prototyping Provide Unique Insights Into Bone Architecture in Osteoporosis. *Anat Rec (New Anat)* 2001; 265: 101–10.
- Bransford R, Goergens E, Briody J, Amanat N, Cree A, Little D. Effect of zoledronic acid in L₆-L₇ rabbit spine fusion model. *Eur Spine J* 2007; 16: 557-62.
- Canto RST, Silveira MA, Rosa AS, Gomide LC, Baraúna MA. Morfologia radiográfica de quadril e pelve e sua relação com fraturas proximais do fêmur. *Rev Bras Ortop* 2003; 38(1/2): 12-20.
- Carvalho MI. Osteoporose: visão do ortopedista. *Rev Bras Ortop* 2006; 41(4): 91-7.

- Carvas JSB. Efeito do metotrexato, do corticosteroide e do ácido zoledrônico na osseointegração de implantes de titânio em um modelo de tíbias de coelhos. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007. 72p.
- Castro FAR, Ribeiro AR. Low incidence of hip fractures in an equatorial area. *Osteoporos Int* 2003; 14(6): 496-9.
- Cheer SM, Noble S. Zoledronic acid. *Drugs* 2001; 61(6): 799-807.
- Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 1228-36.
- Chung G, Keen RW. Zoledronate treatment in active Paget's disease. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 275-6.
- Compston J. Bone Quality: What is it and How is it Measured? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(4): 579-85.
- Cooper C, O'Neill T, Silman A. The epidemiology of vertebral fractures. *Bone* 1993; 14: 89-97.
- Coutinho ESF, Silva SD. Uso de medicamentos como fator de risco para fratura grave decorrente de queda em idosos. *Cad Saúde Pública* 2002; 18(5): 1359-66.
- Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A *et al*. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1467-76.
- Cramer JA, Gold DT, Silverman SL, Lewiecki EM. A systematic review of persistence and compliance with bisphosphonates for osteoporosis. *Osteoporos Int* 2007; 18: 1023-31.
- Cummings SR & Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359: 1761-7.

- Dequeker J, Ortner DJ, Stix AI, Cheng XG, Brys P, Boonen S. Hip fracture and osteoporosis in a XIIIth dynasty female skeleton from Lisht, upper Egypt. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 881-8.
- Dhonukshe-Rutten RA, van Dusseldorp M, Schneede J, de Groot LC, van Staveren WA. Low bone mineral density and bone mineral content are associated with low cobalamin status in adolescents. *Eur J Nutr* 2005; 44(6): 341-7.
- Drumond SN, Paiva EB, Passos AM, Drumond Júnior SN. Osteoporose transitória do quadril: uma perspectiva de tratamento e mudança na história natural da doença. *Rev Bras Ortop* 1999; 34(1): 81-4.
- Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD *et al.* Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vitro by nitrogen-containing bisphosphonates. *JPET* 2001; 296(2): 235-42.
- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK *et al.* Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. Results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* 1999; 282(7): 637-45.
- Fabrício SCC, Rodrigues RAP, Costa Junior ML. Causas e consequências de quedas de idosos atendidos em hospital público. *Rev Saúde Pública* 2004; 38(1): 93-9.
- Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova* 2005; 28(2): 274-80.
- Ferrari S, Rizzoli R. Parathyroid hormone for osteoporosis: why and Who to treat? *Rev Med Suisse* 2005; 1(35): 2272-4.
- Gameiro VS, Schott PCM. A osteoporose em fraturas proximais do fêmur: estudo histomorfométrico. *Rev Bras Ortop* 2006; 41(3): 61-9.
- Gilfillan CP, Strauss BJS, Rodda CP, Bowden DK, Kean AM, Obaid M *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous zoledronic acid

in the treatment of thalassemia-associated osteopenia. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 138-44.

Giordano V, Dias MC, Santos GF, Cabral S, Amaral NP, Albuquerque RP. Estudo radiográfico da extremidade proximal do fêmur para avaliação do risco de fratura osteoporótica. *Rev Bras Ortop* 2007; 42(4): 88-96.

Glatt M, Pataki A, Evans GP, Hornby SB, Green JR. Loss of vertebral bone and mechanical strength in estrogen-deficient rats is prevented by long-term administration of zoledronic acid. *Osteoporos Int* 2004; 15(9): 707-15.

Griz L, Caldas G, Bandeira C, Assunção V, Bandeira F. Paget's disease of bone. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006a; 50(4): 814-22.

Griz L, Colares V, Bandeira F. Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006b; 50(5): 845-51.

Gruer A, Reiner HH, Lunghall S. Formation of neutralizing antibodies after treatment with human calcitonin. *Am J Med* 1993; 95: 439-42.

Guarniero R, Oliveira LG. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. *Rev Bras Ortop* 2004; 39(9): 477-85.

Hamdy RC, Baim S, Broy SB, Lewiecki EM, Morgan SL, Tanner SB, Williamson HF. Algorithm for the management of osteoporosis. *South Med J* 2010; 103(10): 1009-15.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2-12.

Hornby SB, Evans GP, Hornby SL, Pataki A, Glatt M, Green JR. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adults rats. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 519-27.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção preliminar da população do Brasil por sexo e idades simples: 1980-2050 – Revisão 2000. IBGE 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil. O Brasil já tem mais de 180 milhões de habitantes. [Comunicação social de 30 de agosto de 2004]. IBGE 2004a.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período de 1980-2050 – Revisão 2004 metodologias e resultados. Estimativas anuais e mensais da população do Brasil e das unidades da federação: 1980-2020 - Metodologia. Estimativas das populações municipais - Metodologia. IBGE 2004b; 1-82.

Janjacom DMM. Efeito do ácido zoledrônico usado no tratamento de dentes reimplantados tardiamente: estudo em ratos. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009. 86p.

Kanis JA, McCloskey EV. Evaluation of the risk of hip fracture. Bone 1996; 18(3): 127S-32S.

Kiel DP, Felson DT, Anderson JJ, Wilson PWF, Moskowitz MA. Hip fracture and the use of estrogens in postmenopausal women. The Framingham study. N Engl J Med 1987; 317(19): 1169-74.

Komatsu RS, Simões MFJ, Ramos LR, Szejnfeld VL. Incidência de fraturas do femur proximal em Marília, São Paulo, Brasil, 1994 e 1995. Rev Bras Reumatol 1999; 39(6): 325-31.

Korpelainen R, Keinänen-Kiukaanniemi S, Nieminen P, Heikkinen J, Vaananen K, Korpelainen J. Long-term outcomes of exercise: follow-up of a randomization trial in older women with osteopenia. Arch Intern Med 2010; 170(17): 1548-56.

Krey SH. Alternate dietary lifestyles. Prim Care 1982; 9(3): 595-603.

Krucoff C, Carson K, Peterson M, Shipp K, Krucoff M. Teaching yoga to seniors: essential considerations to enhance safety and reduce risk in a uniquely vulnerable age group. J Altern Complement Med 2010; 16(8): 899-905.

- Lane JM, Russell L, Khan S. Osteoporosis. Clin Orthop Relat Res 2000; 372: 139-50.
- Leite MOR. Tratamento da osteoporose pós-menopausa. Arq Bras Endocrinol Metab 1999; 43(6): 442-5.
- Li CY, Schaffler MB, Wolde-Semait H, Hernandez CJ, Jepsen KJ. Genetic background influences cortical bone response to ovariectomy. J Bone Miner Res 2005; 20: 2150-8.
- Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of bisphosphonate (icandronate) on fracture healing of long bones in rats. J Bone Miner Res 1999; 14: 969-79.
- Lin ZW, Pan WQ. Investigation on the rate of bone fracture of primary osteoporosis treated by embedding thread at Shenshu (BL 23) during five years. Zhongguo Zhen Jiu 2010; 30(4): 282-4.
- Little DG, Smith NC, Williams PR, Briody JN, Bilston LE, Smith EJ *et al*. Zoledronic acid prevents osteopenia and increases bone strength in a rabbit model of distraction osteogenesis. J Bone Miner Res 2003a; 18(7): 1300-7.
- Little DG, Peat RA, McEvoy A, Williams PR, Smith EJ, Baldock PA. Zoledronic acid treatment results in retention of femoral head structure after traumatic osteonecrosis in young Wistar rats. J Bone Miner Res 2003b; 18(11): 2016-22.
- Little DG, McDonald M, Bransford R, Godfrey CB, Amanat N. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with OP-1 and zoledronic acid in a rat critical defect model. J Bone Miner Res 2005; 20(11): 2044-52.
- Marques-Neto JF. Resultados da Campanha Nacional de Prevenção da Osteoporose. São Paulo: Merck Sharp & Dome, BG Cultural, 2001. p.13-52.
- Matos MA, Araújo FP, Paixão FB. Os efeitos do zoledronato na remodelação óssea durante o processo de reparação. Acta Cir Bras 2007; 22(2): 115-9.

- Meirik O, Rowe PJ. Research on fertility regulation. Safety and efficacy of existing methods of fertility regulation. In: WHO - World Health Organization. Annual technical report 1998. Geneva: WHO Press, 1999. p. 151-69.
- Nakagi Y, Ito T, Hirooka K, Sugioka Y, Endo H, Saijo Y, Imai H, Takeda H, Kayama F, Sasaki S, Yoshida T. Association between lifestyle habits and bone mineral density in Japanese juveniles. *Environ Health Prev Med* 2010; 15(4): 222-8.
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344(19): 1434-41.
- Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 392-401.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285: 785-95.
- Oliveira JHA, Bracco OL, Kayath M, Guarniero R. Teriparatida (PTH[1-34]rh): uma nova perspectiva no tratamento da osteoporose. *Acta Ortop Bras* 2003; 11(3): 184-9.
- Olmos JM, Vázquez LA, Amado JA, Hernández JL, González Macías J. Mineral metabolism in obese patients following vertical banded gastroplasty. *Obes Surg* 2008; 18(2): 197-203.
- OMS/WHO – World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. [WHO technical report series, n° 843]. Geneva: WHO Press, 1994. p. 1-134.
- OMS/WHO – World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. [WHO technical report series, n° 916]. Geneva: WHO Press, 2003. p. 129-32.

- OMS/WHO – World Health Organization. World health statistics 2006. [Nonserial publication]. Geneva: WHO Press, 2006. p. 21-23.
- Otrock ZK, Azar ST, Shamseddeen WA, Habr D, Inati A, Koussa S *et al.* Intravenous zoledronic acid treatment in thalassemia-induced osteoporosis: results of a phase II clinical trial. *Ann Hematol* 2006; 85: 605-9.
- Ou-Yang G, Wang DY, Xu XM. Clinical observation on acupuncture for treatment of male osteoporosis. *Zhongguo Zhen Jiu* 2011; 31(1): 23-5.
- Palacio EP, Jacob EM, Campi TB, Muller SS. O zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas. Estudo prospectivo e randomizado. *Acta Ortop Bras* 2010; 18(2): 90-5.
- Pataki A, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WSS. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronato and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat Rec* 1997; 249: 458-68.
- Peixoto MEB, Rocha FAC. Reumatologia molecular: do laboratório para o consultório. Aspectos moleculares da osteoporose. *Rev Bras Reumatol* 2001; 41(5): 280-4.
- Pereira FRA, Dutra RC, Olímpio TCR, Muller SS, Palacio EP. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas: estudo prospectivo e randomizado. *Rev Bras Ortop* 2009; 44(1): 61-68.
- Perifanis V, Vyzantiadis T, Tziomalos K, Vakilopoulou S, Garipidou V, Athanassiou-Metaxa M *et al.* Effect of zoledronic acid on markers of bone turnover and mineral density in osteoporotic patients with beta-thalassaemia. *Ann Hematol* 2007; 86: 23-30.
- Perzigian AJ. Osteoporotic bone loss in two prehistoric Indian populations. *Am J Phys Anthropol* 2005; 39(1): 87-95.

- Peter B, Gauthier O, Laïb S, Bujoli B, Guicheux J, Janvier P *et al.* Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res* 2006; 76A: 133-43.
- Phoosuwan M, Kritpet T, Yutanandana P. The effects of weight bearing yoga training on the bone resorption markers of the postmenopausal women. *J Med Assoc Thai* 2009; 92(S5): 102-8.
- Pinheiro MM, Paula AP, Frisoli Jr A, Szejnfeld VL. Geometria femoral: um recurso complementar para avaliação de risco de fratura por osteoporose. *Rev Bras Reumatol* 1999; 38(3): 171-4.
- Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B *et al.* Consenso brasileiro de osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42(6): 343-54.
- Rebar RW. Os ovários. In: Bennett JC & Plum F, editores. *Cecil/Tratado de medicina interna*. 20ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997. p. 1431-53.
- Reid IR, Brown J, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechel U *et al.* Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2002; 346(9): 653-61.
- Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saidi Y *et al.* Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease. *N Engl J Med* 2005; 353(9): 898-908.
- Reifenstein EC Jr, Albright F. The Metabolic Effects of steroid Hormones in Osteoporosis. *J Clin Invest* 1946; 26: 24-56.
- Riggs BL, Melton LJ. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986; 314(26): 1676-86.
- Rosen CJ, Black DM, Greenspan SL. Vignettes in osteoporosis: a road map to successful therapeutics. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 3-10.

- Sadigh S, Reimers A, Andersson R, Laflamme L. Falls and fall-related injuries among the elderly: a survey of residential-care facilities in a Swedish municipality. *J Community Health* 2004; 29(2): 129-40.
- Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 1991; 6(4): 339-46.
- Seibel MJ. Clinical Application of Biochemical Markers of Bone Turnover. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(4): 603-20.
- Shane E, Goldring S, Christakos S, Drezner M, Eisman J, Silverman S *et al.* Osteonecrosis of the jaw: more research needed. [editorial] *J Bone Miner Res* 2006; 21(10): 1503-5.
- Shapiro J, Smith B, Beck T, Ballard P, Dapthary M, BrintzenhofeSzoc K *et al.* Treatment with zoledronic acid ameliorates negative geometric changes in the proximal femur following acute spinal cord injury. *Calcif Tissue Int* 2007; 80(5): 316-22.
- Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P. Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1983; 35(1): 87-99.
- Silveira VA, Medeiros MM, Coelho Filho JM, Mota RS, Noleto JC, Costa FS *et al.* Hip fracture incidence in an urban area in Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 2005; 21(3): 907-12.
- Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht S, Martin TJ, Gillespie MT *et al.* Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(7): 2338-46.
- Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica. Consenso brasileiro em densitometria. São Paulo: SBDens, 2003. p. 1-40.
- Somerman MJ, McCauley LK. Bisphosphonates: sacrificing the jaw to save the skeleton? *BoneKEy-Osteovision* 2006; 3(9): 12-8.

- Souza JAG, Iglesias ACRG. Trauma no idoso. *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48(1): 79-86.
- Souza SCM, Borges CTL, Jorgetti V, Pereira RMR. The effect of intravenous zoledronic acid on glucocorticoid-induced multiple vertebral fractures in juvenile systemic lupus erythematosus. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo* 2004; 59(5): 302-5.
- Srikulmontree T, Massey HD, Roberts WN. Treatment of skeletal Erdheim-Chester disease with zoledronic acid: case report and proposed mechanisms of action. *Rheumatol Int* 2007; 27: 303-7.
- Takahashi M, Wehrli FW, Wehrli SL, Hwang SN, Lundy MW, Hartke J *et al*. Effect of prostaglandin and bisphosphonate on cancellous bone volume and structure in the ovariectomized rat studied by quantitative three-dimensional nuclear magnetic resonance microscopy. *J Bone Miner Res* 1999; 14(5): 680-9.
- Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Lotsikas A, Zachman K, Kales A. Circadian interleukin-6 secretion and quality and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2603-7.
- Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A *et al*. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2119-26.
- Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Care Cancer* 2007; 15: 197-202.
- Wenzel C, Bartsch R, Hussian D, Pluschnig U, Locker GJ, Sevela U *et al*. Zoledronate in a patient with pamidronate refractory hypercalcemia syndrome. *Support Care Cancer* 2004; 12: 678-81.
- Wimalawansa SJ. Combined therapy with estrogen and etidronate has an additive effect on bone mineral density in the hip and vertebrae: four year randomized study. *Am J Med* 1995; 99: 36-42.

- Wise LM, Waldman SD, Kasra M, Cheung R, Binnington A, Kandel RA *et al.* Effect of zoledronate on bone quality in the treatment of aseptic loosening of hip arthroplasty in the dog. *Calcif Tissue Int* 2005; 77: 367-75.
- Woolf AD. Strong bones in later life. [editorial] *Bulletin of the World Health Organization* 1999; 77(5): 368-9.
- Wucher H, Cianqura C, Poitou C, Czernichow S. Effects of weight loss on bone status after bariatric surgery: association between adipokines and bone markers. *Obes Surg* 2008; 18(1): 58-65.
- Yamk B, Turkay C, Atalar H. Hepatotoxicity induced by alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2007; 18: 829-31.
- Zehnder Y, Risi S, Michel D, Knecht H, Perrelet R, Kraenzlin M *et al.* Prevention of bone loss in paraplegics over 2 years with alendronate. *J Bone Miner Res* 2004; 19(6): 1067-74.

*II. Artigo Original 1**

* Padronizado de acordo com as normas para publicação na revista

Osteoporosis International

OS EFEITOS DO ÁCIDO ZOLÊDRÔNICO SOBRE O PESO E A DENSIDADE ÓSSEA DE RATAS OOFORECTOMIZADAS

RESUMO

Objetivo: Investigar as repercussões do ácido zoledrônico sobre o peso e sobre a densidade femoral de ratas com osteoporose, secundária à ooforectomia bilateral, após nove e doze meses de administração da droga. Métodos: Foram estudadas, aleatória e prospectivamente, 80 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Com 60 dias de vida, os animais foram sorteados em dois grupos de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: ooforectomia bilateral (grupo O) (n=40) e cirurgia placebo (*sham*) (grupo S) (n=40). Após trinta dias de pós-operatório, os animais foram sorteados em quatro grupos, de acordo com a administração intraperitoneal de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) ou água destilada (AD): OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) e SAD (n=20). Os animais foram sacrificados nove e doze meses após a administração das substâncias, tendo seus fêmures direitos retirados e analisados. Para o estudo do peso (g), foi considerado a curva evolutiva do mesmo, ao longo do experimento. Para o estudo densitométrico, foram realizadas radiografias digitais das peças anatômicas e estas submetidas à análise densitométrica com a ajuda do programa de análise de imagens específicos. Resultados: O ácido zoledrônico e o momento do sacrifício, não tiveram efeito sobre o peso dos animais. A ooforectomia aumentou, significativamente, o peso dos animais, aos nove meses. Houve aumento significativo da densidade óssea femoral nos animais que fizeram uso do ácido zoledrônico. A ooforectomia diminuiu, significativamente, a densidade óssea dos

animais que receberam água destilada, aos nove meses. Quanto ao efeito do tempo, verificou-se a diminuição, significativa, da densidade óssea, nos animais que receberam água destilada, sacrificados aos 12 meses, comparativamente aos sacrificados aos nove meses. Conclusão: O ácido zoledrônico não teve influência sobre o peso dos animais, aumentando, contudo, de maneira significativa, a densidade óssea femoral dos mesmos.

Descritores: Ácido zoledrônico; densitometria; ooforectomia; osteoporose; rato.

ABSTRACT

Objective: To investigate the clinical and densitometric effects of zoledronic acid in the femurs of female osteoporotic rats due to bilateral oophorectomy, after a follow up period of nine and twelve months. Methods: Eighty female rats (*Rattus norvegicus albinus* – Wistar lineage) were randomly and prospectively assessed. Within 60 days, animals were randomized into two groups regarding the surgical procedure: bilateral oophorectomy (group O) (n=40) and sham surgery (group S) (n=40). When animals were 90 days old, groups O and S were randomized into four groups, according to the intraperitoneal administration of 0.1mg/kg of zoledronic acid (AZ) or distilled water (AD): OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) and SAD (n=20). Animals were euthanized nine and twelve months after the administration of substances, and their right femurs removed and analyzed. The weight of the animals was monthly recorded throughout the study. The densitometric study was performed through the analysis of femoral digital radiographies using specific images analysis computer programs. Results: At nine months, the ovariectomized groups had a significant increase in the weight (g) regardless of the substance administered. At twelve months there was no

difference in the weight among groups. There was a significant increase in femoral bone density in animals which have made use of zoledronic acid regardless oophorectomy and follow up period. Conclusions: Zoledronic acid had no influence in the weight of the animals, significantly increasing their femoral bone density.

Key words: osteoporosis, zoledronic acid, densitometry, rats, ovariectomy.

INTRODUÇÃO

As transformações tecnológicas ocorridas durante o último século, o avanço da Medicina e o processo migratório da população em direção às grandes cidades, levaram ao aumento da expectativa de vida da população, promovendo um fenômeno nunca antes reconhecido: o real envelhecimento da população brasileira[1-3]. O Censo populacional de 2004 prevê que, a partir do ano 2010, haverá um aumento da parcela da população, com mais de 60 anos, de, aproximadamente, 31%, até o ano 2050[3]. As doenças crônico-degenerativas tornar-se-ão cada vez mais comuns e, dentre elas, a osteoporose, bem como, as fraturas relacionadas à mesma, assumirão um papel relevante[4].

A perda gradual da massa óssea e a consequente deterioração de sua microarquitetura[5], aumentam o risco de fraturas, principalmente vertebrais, femorais e do rádio distal[6-8], devido à diminuição hormonal, característica da menopausa. Alguns autores afirmam que, em média, aos 65 anos, a mulher já perdeu cerca de 25% de sua massa óssea[9-10]. A densitometria óssea (DXA) é o exame de escolha para o diagnóstico e o controle do tratamento da osteoporose. Trata-se de um exame não invasivo, capaz de registrar a densidade, ou a quantidade de cálcio, dos principais sítios de fraturas patológicas: as vértebras e a

região proximal femoral. Em corpos de menor escala, a densitometria digital óptica, um exame validado em nível mundial, tem sido largamente utilizada[11-13].

A poupança óssea, realizada durante a mocidade, é um dos fatores primordiais para instalação ou não da osteoporose[7-8]. Em alguns casos, a terapia medicamentosa, como os bisfosfonatos, associada a exames de imagem, como a densitometria, tornam-se a medida mais eficaz para reverter ou, mais comumente, impedir o avanço da doença e de muitas de suas sequelas[7,15-16]. Muitos também são os efeitos adversos causados pela administração contínua destes fármacos, o que diminui, em grande escala, a adesão dos pacientes ao tratamento.

O ácido zoledrônico, em infusão endovenosa única anual, promete diminuir os efeitos colaterais decorrentes do uso diário desta classe farmacológica[17-18], bem como eliminar a baixa adesão dos pacientes ao tratamento. O presente estudo foi delineado com o objetivo de se minimizar a carência de estudos experimentais sobre o tema, bem como, o de se investigar os possíveis efeitos do ácido zoledrônico sobre a massa corporal e a densidade óssea femoral em ratas pós-ooforectomia.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Recepção dos animais e adaptação ao ambiente experimental

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o nº 622/2007.

O tamanho amostral foi determinado previamente ao início do estudo, através de testes estatísticos específicos, levando-se em consideração os riscos α

(5%) e β (20%), bem como a variabilidade das variáveis, chegando-se a um valor mínimo de 10 indivíduos por grupo.

Foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Campus Botucatu.

Os animais que, à recepção, contavam com 30 dias de vida, depois de clinicamente avaliados e pesados, foram alojados em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura controlada e ciclo de luz claro-escuro, sendo oferecido aos mesmos ração para roedores (Labina[®], Nestlé Purina PetCare Company[®]) e água *ad libitum*.

2. Delineamento experimental

Todas as etapas do processo experimental estão sumarizadas na figura 1.

2.1. Procedimentos cirúrgicos

Trinta dias após a chegada ao laboratório, aos 60 dias de vida, quando atingiram a idade reprodutiva, os animais foram sorteados em dois grupos, pelo método de sorteio de envelopes opacos e lacrados, de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: grupo O (ooforectomia) (n=40) e grupo S (cirurgia *sham*) (n=40).

O procedimento operatório de ooforectomia foi realizado após anestesia intraperitoneal, com 30 mg/kg de pentobarbital sódico 3%, e tricotomia dorsolateral, logo abaixo da última costela, bilateralmente. Os animais foram então submetidos à assepsia regional com água e sabão, antissepsia com solução aquosa 0,2% de

clorexidina (Riohex, Rioquímica[®]) e posicionados em mesa cirúrgica, em decúbito lateral. Foi realizada uma incisão transversal na pele com, aproximadamente, 1,5 centímetros de comprimento, entre a última costela e a articulação coxofemoral. A cavidade peritoneal foi exposta, ultrapassando-se o plano muscular por divulsão, permitindo-se o acesso ao ovário envolto em tecido adiposo (figura 2a). Procedeu-se à ligadura do ovário, com fio de algodão 3.0 (Paramed[®]), e secção do mesmo distalmente à ligadura (figura 2b). A musculatura e a pele foram aproximadas com fio Mononylon^{*} 3-0 (Ethicon[®]), repetindo-se os mesmos procedimentos no lado contralateral, para a retirada do outro ovário.

Os animais do grupo S foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos, com exceção dos tempos cirúrgicos de ligadura e secção dos ovários.

2.2. Administração das substâncias

Trinta dias após os procedimentos cirúrgicos, aos 90 dias de vida, após novo sorteio, os grupos O e S foram divididos em quatro subgrupos, de acordo com a administração, intraperitoneal, de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) (Aclasta[™], Novartis[®] Biociências S.A.) ou água destilada (AD), completando-se os grupos: OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) e SAD (n=20).

Durante todo o período de experimento, os animais foram pesados mensalmente.

2.3. Eutanásia dos animais (Momentos 1 e 2)

Os sacrifícios foram realizados nove e 12 meses após a administração das substâncias (Momentos 1 e 2), quando dez animais de cada grupo foram aleatoriamente sacrificados com dose letal, intraperitoneal, de 80mg/kg de

pentobarbital sódico 3%, tendo seus fêmures direitos desarticulados, na região proximal (quadril) e distal (joelho), com a retirada de todas as partes moles (músculos, tendões e ligamentos).

As peças anatômicas foram então envolvidas em gaze, embebida em soro fisiológico 0,9%, embaladas em papel alumínio, identificadas e, imediatamente, enviadas para a realização dos ensaios densitométricos.

3. Análise do Peso

A pesagem, em gramas, dos animais foi realizada mensalmente ao longo de todo o experimento, sempre no mesmo dia do mês, pelo pesquisador principal, utilizando-se balança eletrônica portátil modelo Scout Pro SP602 (Toledo[®]), com capacidade de 600 g / 0,01 g.

4. Análise Densitométrica

Para a análise densitométrica, utilizou-se um aparelho de raios-X convencional modelo GE 100 (General Electric, Milwaukee – USA), filmes radiográficos de 24 x 30 cm (Braf, Kodak Brasileira Com. Ind. Ltda.) e chassi de tamanho correspondente. A distância do foco emissor de raios-X foi padronizada em 50 cm. As imagens foram obtidas utilizando-se uma potência de 50 quilovoltpico (kVp) e 10 miliamperes (mA) de corrente, sempre associado ao uso de colimador (figura 3a).

As peças anatômicas, devidamente identificadas com numerais de chumbo, foram posicionadas sobre a placa óptica do programa de análise de imagens, juntamente com uma escala padronizada de referência de alumínio maciço (Al-Mg-Si), denominada penetrômetro ou *phantom*, com vinte e cinco degraus, cada

um com 1 mm de espessura. As imagens radiográficas digitais resultantes foram lidas pelo *scanner* do próprio equipamento e manipuladas dentro do ambiente do programa Digora® (Orion Corporation – Helsinki, Finland). Este programa, largamente utilizado na Odontologia norte-americana, é capaz de determinar o valor, em módulo, da radiopacidade de determinado material, de acordo com a variação do espectro de cores cinza da imagem radiológica analisada, comparando-a com a do penetrômetro de alumínio. Após a determinação de uma área de 6mm², localizada na região intertrocantérica dos fêmures, definida como região de interesse (“ROI” – *Region of Interest*), a avaliação da densidade óssea foi realizada automaticamente. O próprio programa é capaz de converter os valores densitométricos obtidos em módulo, para milímetros de alumínio (mmAl), baseando-se na densidade do penetrômetro de alumínio de referência.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância, no modelo inteiramente casualizado, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas, utilizando-se, para tanto, os programas SigmaStat® versão 3.5.1.2 (Systat Software, Inc., Germany, 2006) e Minitab® versão 15.1.30.0 (Minitab Inc., 2007). O estudo das variáveis foi realizado por meio da técnica da análise de variância para um experimento fatorial do tipo 2x2x2 (três fatores, cada um com dois níveis):

- Tipo de procedimento cirúrgico: ooforectomia e cirurgia *sham*
- Substância administrada: ácido zoledrônico e água destilada
- Momento do sacrifício: nove e 12 meses

Os resultados dos procedimentos estatísticos foram apresentados em tabelas e gráficos, contendo medidas descritivas de tendência central (média) e variabilidade (desvio-padrão), com os respectivos indicadores de significância ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Com relação à substância administrada, a análise de variância mostrou não ter havido influência do ácido zoledrônico sobre o peso dos animais (tabela 1) (figura 4). Em se tratando da densidade óssea, verificou-se o aumento significativo desta variável nos animais que fizeram uso do ácido zoledrônico (grupos OAZ e SAZ), em relação àqueles que receberam água destilada (grupos OAD e SAD) (tabela 2) (figura 5).

Em se tratando do procedimento cirúrgico, verificou-se o aumento significativo da massa corporal dos animais, submetidos à ooforectomia (grupos OAD e OAZ), aos nove meses (Momento 1), esta diferença, contudo, não se manteve até os doze meses (Momento 2) (tabela 1). Observou-se também, a diminuição significativa da densidade óssea nos animais ooforectomizados que fizeram uso de água destilada (OAD), aos nove meses (Momento 1) em relação ao grupo *sham* (SAD). Esta diferença, contudo, não se manteve até os doze meses (Momento 2) (tabela 2).

Analisando-se o efeito do tempo, o estudo das variâncias mostrou não ter havido influência do momento de eutanásia sobre o peso dos animais (tabela 1). Observou-se, contudo, a diminuição significativa da densidade óssea dos animais

avaliados no Momento 2 (doze meses), que receberam água destilada (grupos OAD e SAD), comparativamente ao Momento 1 (tabela 2).

DISCUSSÃO

O ácido zoledrônico, um novo e poderoso bisfosfonato, age inibindo a ação osteoclástica e, conseqüentemente, diminuindo a reabsorção óssea[19-20]. O osso do tipo trabecular é o principal sítio de ação da droga, que parece manter a espessura e a densidade de suas trabéculas, aumentando, por conseguinte, a resistência às fraturas[21-23]. Pacientes com osteoporose, principalmente a primária do tipo I (pós-climatério), que apresentam uma alta atividade osteoclástica, podem beneficiar-se deste bisfosfonato de 3ª geração, simplesmente mantendo sua massa óssea trabecular[24].

Para a realização deste estudo, o rato foi o animal escolhido por possuir características próximas às dos seres humanos, no que se refere aos sistemas musculoesquelético e hormonal, além da facilidade de manuseio, disponibilidade em biotério e baixo custo[25-27]. Diversos autores utilizaram o rato em estudos relacionados à agressão ao tecido ósseo[28-35]. Saville[36], em 1969, foi um dos pioneiros na utilização de ratas ooforectomizadas, para o estudo da osteoporose, observando menor quantidade de cálcio por unidade de volume do osso. Além das semelhanças musculoesqueléticas, o rato possui grande semelhança com relação ao ciclo hormonal humano, passando também pelo período de menopausa e apresentando alterações fisiológicas semelhantes[37-39]. Apresenta ciclo biológico, da infância à senilidade, mais curto, em torno de 15 meses, permitindo realizar delineamentos que simulem todo o período de vida humana[40]. Em estudo

recente[41], foi observado que fêmeas de ratas da linhagem Sprague-Dowley evoluem com osteoporose sistêmica, detectável aos exames microtomográficos, duas semanas após o procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral.

Em se tratando do peso, pôde-se observar que, embora os animais tenham apresentado um desenvolvimento gaussiano ao longo de todo o experimento, foi possível observar o aumento significativo do peso nos grupos ooforectomizados (OAD e OAZ), aos nove meses, quando comparados aos grupos não-ooforectomizados (SAD e SAZ). A alteração do perfil lipídico e o consequente aumento da massa corporal após o climatério, ocorre, principalmente, em função da deficiência de estrógenos, levando ao acúmulo periférico do tecido adiposo e à alterações na distribuição de gordura[42]. Achados semelhantes foram obtidos por diversos autores[25,28-30,32-33,43-46]. Aos doze meses (Momento 2), as diferenças entre os pesos não puderam mais ser identificadas, uma vez que os efeitos da privação hormonal acabaram por se manifestar, fisiologicamente, também nos animais dos grupos não-ooforectomizados (SAD e SAZ), que igualaram seus pesos aos dos animais dos grupos ooforectomizados (OAD e OAZ). Os resultados obtidos revelam que o ácido zoledrônico não teve qualquer influência no aumento do peso dos animais, fato também comprovado por Hornby *et al.*[47], Otroock *et al.*[48], Gilfillan *et al.*[49] e Reid *et al.*[18].

A densitometria óssea, por meio de digitalização e processamento de imagens radiológicas, tem sido cada mais utilizada devido aos crescentes avanços relacionados à computação gráfica. A facilidade e agilidade com que a aquisição dos resultados finais pode ser obtida, associado aos baixos custos dispendidos, quando comparados aos exames convencionais de densitometria (DXA), levou diversos autores a pesquisar e validar diferentes técnicas de aquisição e manipulação de

imagens radiológicas digitais para a análise densitométrica[50-54]. Neste estudo, o programa de análise de imagens forneceu a densidade óssea femoral de maneira indireta, comparando os infinitos tons cromáticos de cinza das imagens radiográficas, aos da escala padronizada do penetrômetro, traduzindo as densidades ósseas femorais em unidades de milímetros de alumínio (mmAl).

Estatisticamente, os animais que fizeram uso do ácido zoledrônico (OAZ e SAZ) apresentaram densidade óssea maior que aqueles que fizeram uso de água destilada (OAD e SAD), independentemente do procedimento cirúrgico realizado ou do momento da eutanásia. Sabe-se que a privação hormonal provoca um estímulo negativo progressivo sobre o sistema osteoblástico (*feedback* negativo), fazendo com que o sistema osteoclástico torne-se facilitado, fatos que, invariavelmente, culminam em desmineralização óssea[29,32,43,55-58]. Neste estudo, o ácido zoledrônico, que bloqueia a organização do citoesqueleto e motilidade dos osteoclastos, parece ter promovido a proteção do tecido ósseo, mantendo a densidade femoral nos animais que fizeram uso da droga.

CONCLUSÕES

O ácido zoledrônico administrado intraperitonealmente, na concentração de 0,1mg/kg, não mostrou influência sobre o peso dos animais, aumentando, significativamente, a densidade óssea da região proximal de fêmures de ratas ooforectomizadas, após nove e doze meses de observação.

REFERÊNCIAS

1. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil. O Brasil já tem mais de 180 milhões de habitantes. [Comunicação social de 30 de agosto de 2004]. IBGE 2004.
2. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção preliminar da população do Brasil por sexo e idades simples: 1980-2050 – Revisão 2000. IBGE 2000.
3. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período de 1980-2050 – Revisão 2004 metodologias e resultados. Estimativas anuais e mensais da população do Brasil e das unidades da federação: 1980-2020 - Metodologia. Estimativas das populações municipais - Metodologia. IBGE 2004; 1-82.
4. OMS/WHO – World Health Organization. World health statistics 2006. [Nonserial publication]. Geneva: WHO Press, 2006. p. 21-23.
5. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. JAMA 2001;285:785-795.
6. Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. J Bone Miner Res 2000; 15: 392-401.
7. Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B *et al*. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. Rev Bras Reumatol 2002; 42(6): 343-54.
8. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 2001; 285: 785-95.
9. Carvalho MI. Osteoporose: visão do ortopedista. Rev Bras Ortop 2006;41(4):91-7

10. Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B *et al.* Consenso brasileiro de osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42(6): 343-54.
11. Takahashi M, Yukata K, Matsui Y, Abbaspour A, Takata S, Yasui N. Bisphosphonate modulates morphological and mechanical properties in distraction osteogenesis through inhibition of bone resorption. *Bone* 2006; 39: 573-81.
12. Duan Y, Turner CH, Kim BT, Seeman E. Sexual Dimorphism in Vertebral Fragility is More the Result of Gender Differences in Age-Related Bone Gain Than Bone Loss. *J Bone Miner Res* 2001; 16(12): 2267-75.
13. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P *et al.* Predictive Value of BMD for Hip and Other Fractures. *J Bone Miner Res* 2005; 20(7): 1185-94.
14. Notelovitz M. Osteoporose: prevenção, diagnóstico e conduta. Rio de Janeiro: EPUC, 2001.
15. Leite MOR. Tratamento da osteoporose pós-menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999; 43(6): 442-5.
16. Guarniero R, Oliveira LG. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. *Rev Bras Ortop* 2004; 39(9): 477-85.
17. Perifanis V, Vyzantiadis T, Tziomalos K, Vakalopoulou S, Garipidou V, Athanassiou-Metaxa M *et al.* Effect of zoledronic acid on markers of bone turnover and mineral density in osteoporotic patients with beta-thalassaemia. *Ann Hematol* 2007; 86: 23-30.

18. Reid IR, Brown J, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechel U *et al.*
Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2002; 346(9): 653-61.
19. Amanat N, Brown R, Bilston LE, Little DG. 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* 2005; 23: 1029-34.
20. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD *et al.*
Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vitro by nitrogen-containing bisphosphonates. *JPET* 2001; 296(2): 235-42.
21. Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Carc Cancer* 2007; 15: 197-202.
22. Griz L, Colares V, Bandeira F. Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(5): 845-51.
23. Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova* 2005; 28(2): 274-80.
24. Riggs BL, Melton ILJ. Medical progress: involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986; 14:1676.
25. Marques KP, Taveira LAA. Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas. *Rev Fob* 1998; 6:9-18.
26. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 2003; 95(1): 300- 7.

27. Paz LHBC, Jorgetti V, Yoshinari NH. Modelos animais de osteoporose. *Rev Hosp Calem Fac Med São Paulo*; 1997; 52(2): 86-9.
28. Myburgh HK, Noakes TD, Roodt M, Hough FS. Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. *J Appl Physiol*. 1989; 66:14-9.
29. Barengolts EL, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner*. 1994; 26:133-40.
30. Peng Z, Tuukanen J, Vaananen HK. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1994; 9:1559-64.
31. Tuukanen J, Peng Z, Vaananen HK. Effect of running exercise on the bone loss induced by orchidectomy in the rat. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: p.33-7.
32. Omy N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*. 1995; 17: 163s-8.
33. Flieger J, Karachalios TH, Khaldi, L, Raptou P, Lyritis G. Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1998;63: 510-4.
34. Tamaki T, Akamine T, Goshi N, Kurata H, Sakou T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomy rats. *Bone* 1998; 23:47-53.
35. Rico H, Gomes-Raso N, Revilla M, Hernández ER, Secco C, Páez E, et al., Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats: a morphometric and densitometric study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 90: 97-101.

36. Saville PD. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. *J Am Geriatric Soc* 1969; 17: 155-66.
37. Thompson A, Skinner A, Piercy J. *Fisioterapia de Tidy*. 12^a ed. São Paulo: Santos; 1994. p. 466-7.
38. Kaye M, Kusy RP. Genetic lineage, bone mass, and physical activity in mice. *Bone* 1995; 17: 131-5.
39. Marques KP, Taveira LAA. Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas. *Rev Fob* 1998; 6: 9-18.
40. Vogel HG. Influence of maturation and aging on mechanical and biomechanical properties of connective tissue in rats. *Mech Ageing Dev.* 1980; 14:283-92.
41. Perilli E, Le V, Ma B, Salmon P, Reynolds K, Fazzalari NL. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporos Int* 2010; 21(8): 1371-82.
42. Dias R, Luca LA, Ramos MD, Antonini FR, Rudge MVC. Avaliação da atividade estrogênica após a menopausa. *J Bras Ginecol* 1982; 92: 261- 9.
43. Cliquet Jr A, Carvalho DCL. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras* 2003; 11(1): 17- 24.
44. Netto CC, Franco M, Cunha MSCAM, Kenji C. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. *R Ci Med Biol* 2006; 5(3): 231-8.
45. Castro CHM. Modelos animais em osteoporose. In: Szeejnfeld VL. *Osteoporose diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Sarvier; 2000. p.46-53.
46. Bagi CM, Wilkie D, Georgelos K, Wilians D, Bertolini D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. *Bone*.1997; 21:261-7.

47. Hornby SB, Evans GP, Hornby SL, Pataki A, Glatt M, Green JR. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adults rats. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 519-27.
48. Otrock ZK, Azar ST, Shamseddeen WA, Habr D, Inati A, Koussa S *et al.* Intravenous zoledronic acid treatment in thalassemia-induced osteoporosis: results of a phase II clinical trial. *Ann Hematol* 2006; 85: 605-9.
49. Gilfillan CP, Strauss BJS, Rodda CP, Bowden DK, Kean AM, Obaid M *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous zoledronic acid in the treatment of thalassemia-associated osteopenia. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 138-44.
50. Louzada MJQ, Pelá CA, Belangero WD, Santos-Pinto R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. *Rev Bras Eng Cad Eng Biomed* 1998; 14: 37-47.
51. Villarreal PM, Junqueira LM, Martínez A, Consuegra LG. Study of mandibular fracture repair using quantitative radiodensitometry: a comparison between maxilomandibular and rigid internal fixation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 776-81.
52. Lee J, Shin HI, Kim SY. Fractional quantitative computed tomography for bone mineral density evaluation accuracy, precision, and comparison to quantitative computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 566–71.
53. Morasolli ARC. Análise da cronologia da reparação óssea por meio da densidade óptica em imagens radiográficas digitais diretas nas osteotomias realizadas com radiação laser de dióxido de carbono (CO₂) e broca, em fêmures de ratos. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2004. 92p.

54. Louzada MJQ, Pelá CA, Belangero WD, Santos-Pinto R. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. *Rev Bras Eng Cad Eng Biomed* 1998; 14: 47-64.
55. Kanis JA, McCloskey EV. Evaluation of the risk of hip fracture. *Bone* 1996; 18 (suppl 3): 127-32.
56. Compston J, Smith T. Osteoporose. *Isto É – Guia da Saúde Familiar*; 2001; 91.
57. Pickles B, Compton A, Cott C. Fisioterapia na terceira idade. São Paulo: Santos; 1998; p.213-29.
58. Lindsay R, Cosman F. Primary Osteoporosis. In: Coe FL, Favus MJ. *Disorder of bone and mineral metabolism*. Raven Press 1992; 831-88.

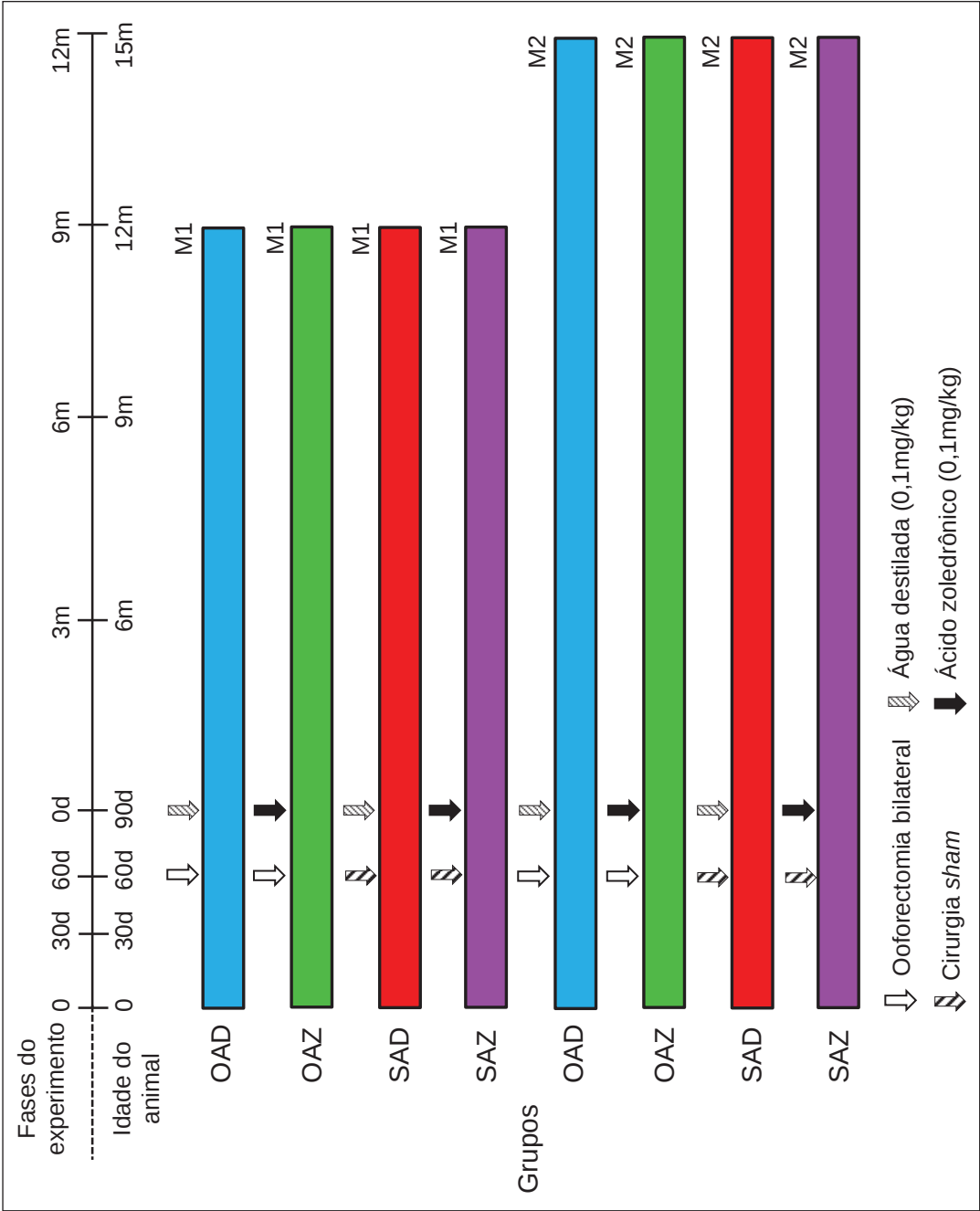


Figura 1 – Sumário das fases do experimento (linha do tempo).



Figura 2a – Aspecto do ovário, em meio ao tecido adiposo, previamente à sua ligadura e secção.



Figura 2b – Aspecto da secção do ovário, distalmente à sua ligadura.



Figura 3a – Imagens radiográficas digitais femorais, previamente à análise densitométrica.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão do peso dos animais (g), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	385 ± 56	372 ± 11
	Ácido Zoledrônico	OAZ	368 ± 78	361 ± 42
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	330 ± 68	337 ± 53
	Ácido Zoledrônico	SAZ	314 ± 36	334 ± 59

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

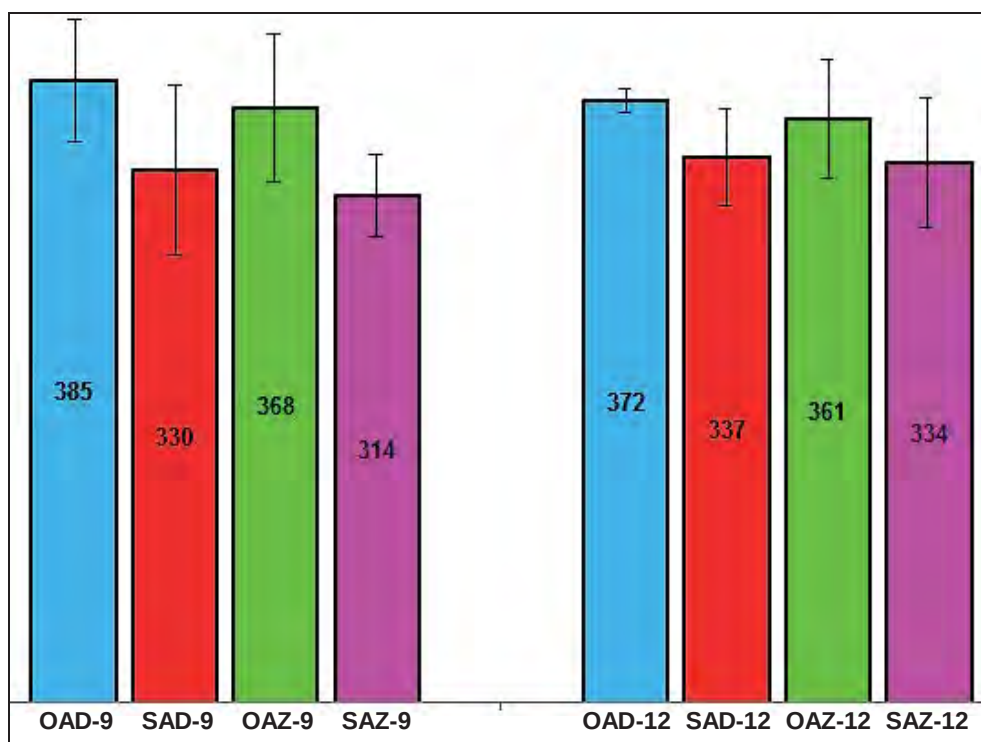


Figura 4 – Médias e desvios-padrão do peso (g) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão da densidade femoral (mmAl), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	18,3 ± 1,5	16,4 ± 0,9
		OAZ	19,9 ± 1,9	22,4 ± 1,2
	Ácido Zoledrônico	OAD	18,3 ± 1,5	16,4 ± 0,9
		OAZ	19,9 ± 1,9	22,4 ± 1,2
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	19,2 ± 1,9	17,8 ± 1,0
		SAZ	21,4 ± 1,0	23,3 ± 0,8
	Ácido Zoledrônico	SAD	19,2 ± 1,9	17,8 ± 1,0
		SAZ	21,4 ± 1,0	23,3 ± 0,8

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

± Diferença significativa entre o momento de eutanásia.

† Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

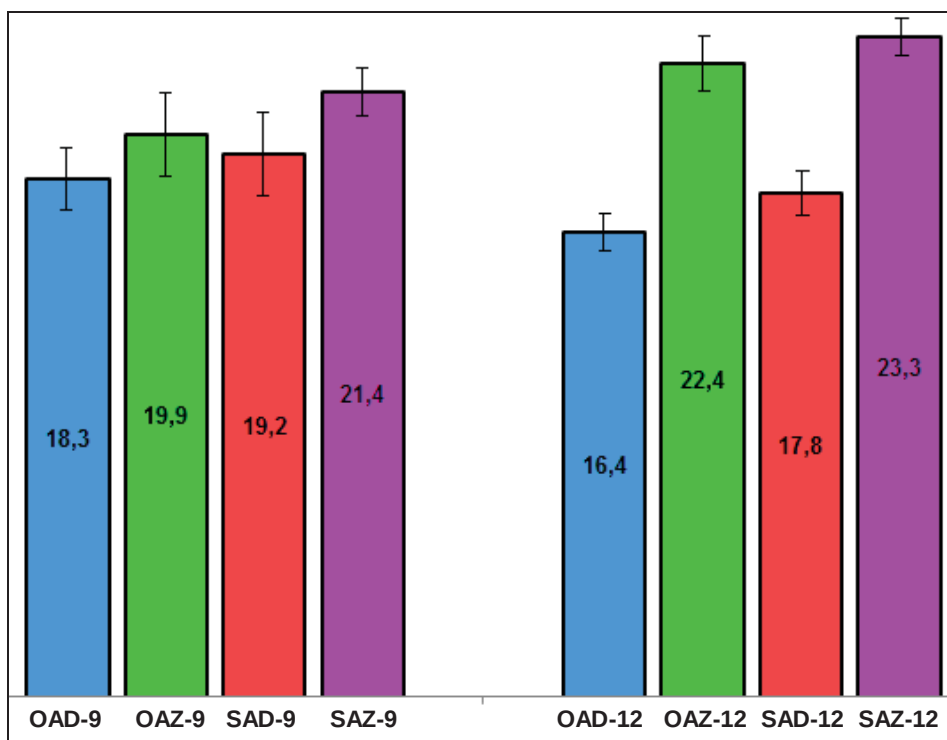


Figura 5 – Médias e desvios padrões da densidade femoral (mmAl) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

*III. Artigo Original 2**

* Padronizado de acordo com as normas para publicação na revista

The Journal of Bone and Joint Surgery [Br]

EFEITOS BIOMECÂNICOS DO ÁCIDO ZOLÊDRÔNICO SOBRE OS FÊMURES DE RATAS OSTEOPORÓTICAS

RESUMO

Objetivo: Investigar as repercussões biomecânicas do ácido zoledrônico em fêmures de ratas com osteoporose, provocada por ooforectomia bilateral, após nove e doze meses de administração da droga. **Métodos:** Foram estudadas, aleatória e prospectivamente, 80 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Com 60 dias de vida, os animais foram sorteados em dois grupos, de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: ooforectomia bilateral (grupo O) (n=40) e cirurgia placebo (*sham*) (grupo S) (n=40). Após trinta dias de pós-operatório, os animais foram sorteados em quatro grupos, de acordo com a administração intraperitoneal de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) ou água destilada (AD): OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) e SAD (n=20). Os animais foram sacrificados nove e doze meses após a administração das substâncias, tendo seus fêmures direitos retirados e analisados. Para o estudo biomecânico, foram realizados ensaios de compressão axial das peças anatômicas, com interesse na região proximal do fêmur, analisando-se as variáveis: carga máxima (N), limite de elasticidade (N) e coeficiente de rigidez (N/mm). **Resultados:** O ácido zoledrônico aumentou, de maneira significativa, a carga máxima e o limite de elasticidade, diminuindo o coeficiente de rigidez das peças anatômicas, independentemente do tipo de cirurgia e do tempo de observação. **Conclusão:** O ácido zoledrônico, na dose de 0,1mg/kg, aumentou, significativamente, a carga máxima e o limite de elasticidade, diminuindo o coeficiente de rigidez, em fêmures de ratas com osteoporose, causada por ooforectomia bilateral.

Descritores: Ácido zoledrônico; biomecânica; ooforectomia; osteoporose; rato.

ABSTRACT

Objective: To investigate the biomechanical effects of zoledronic acid in the femurs of female rats with osteoporosis due to bilateral oophorectomy, after a follow up period of nine and twelve months. **Methods:** Eighty female rats (*Rattus norvegicus albinus* – Wistar lineage) were randomly and prospectively assessed. Within 60 days, animals were randomized into two groups regarding the surgical procedure: bilateral oophorectomy (group O) (n=40) and sham surgery (group S) (n=40). When animals were 90 days old, groups O and S were randomized into four groups, according to the intraperitoneal administration of 0.1mg/kg of zoledronic acid (AZ) or distilled water (AD): OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) and SAD (n=20). Animals were euthanized nine and twelve months after the administration of the substances, and their right femurs removed and analyzed. For the biomechanical study, axial compression tests were performed with interest in the proximal femur, getting the maximum load (N), the yield point (N) and stiffness coefficient (N/mm). **Results:** Zoledronic acid significantly increased the maximum load and the yield point, decreasing the stiffness coefficient regardless oophorectomy and the follow up period. **Conclusion:** Zoledronic acid, at a dose of 0.1mg/kg, significantly increased the maximum load and the yield point, decreasing the stiffness coefficient in the femurs of female rats with osteoporosis caused by bilateral oophorectomy.

Key words: Zoledronic acid; biomechanics; osteoporosis; ovariectomy; rats.

INTRODUÇÃO

A osteoporose pode ser considerada uma pandemia. Dados de 1991 estimavam que dentre as populações dos Estados Unidos, Europa e Japão, cerca de 75 milhões de pessoas estivessem afetadas pela enfermidade^(1,2). Estima-se que ocorram mundialmente, aproximadamente, 1,66 milhões de fraturas anuais devido à osteoporose e que, até o ano 2050, este número quadruplique⁽³⁾. Não se pode negar, pois, que a osteoporose seja um problema de Saúde Pública mundial.

Esta é uma doença que se manifesta de forma insidiosa e silenciosa, tendo as fraturas como seus primeiros sintomas⁽⁴⁻⁶⁾. Estas fraturas caracterizam-se por serem consequentes à perda de massa óssea e à fragilidade da arquitetura microscópica do tecido. Alguns medicamentos, como os bisfosfonatos, tem sido capazes de interromper e, até mesmo, reverter o processo degenerativo ósseo imposto pela doença.

Os bisfosfonatos são medicamentos derivados do pirofosfato, utilizados em enfermidades que apresentam alta remodelação óssea como a doença de Paget, tumores ósseos, hipercalcemia maligna e a osteoporose⁽⁷⁻⁹⁾. Devido sua alta afinidade pelo cálcio ósseo, estas substâncias agem especificamente no tecido esquelético, diminuindo sua reabsorção, pela ação inibitória sobre os osteoclastos⁽¹⁰⁻¹²⁾. O ácido zoledrônico, um novo bisfosfonato, tem se mostrado o mais potente inibidor da reabsorção óssea do que qualquer outro⁽¹³⁻¹⁵⁾. Estudos demonstram uma efetividade até 100 vezes maior que o Alendronato, o mais comum bisfosfonato prescrito no Brasil, e de até 10.000 vezes, quando comparado ao Etidronato⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

Várias questões, sobre o mecanismo de ação dos diversos bisfosfonatos existentes na morfologia das microestruturas ósseas, ainda permanecem obscuras ou sem resposta. Sabe-se, contudo, que as fraturas osteoporóticas estão

intimamente relacionadas à aplicação de forças, diretas ou indiretas, sobre o tecido ósseo fragilizado, provocando falhas na continuidade de suas trabéculas.

A investigação dos principais parâmetros micromorfológicos do tecido ósseo de ratas osteoporóticas, sob efeito do ácido zoledrônico, o mais poderoso bisfosfonato existente, é o objetivo deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Recepção dos animais e adaptação ao ambiente experimental

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o nº 622/2007.

O tamanho amostral foi determinado previamente ao início do estudo, através de testes estatísticos específicos, levando-se em consideração os riscos α (5%) e β (20%), bem como a variabilidade das variáveis, chegando-se a um valor mínimo de 10 indivíduos por grupo.

Foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Campus Botucatu.

Os animais que, à recepção, contavam com 30 dias de vida, depois de clinicamente avaliados e pesados, foram alojados em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura controlada e ciclo de luz claro-escuro, sendo oferecido aos mesmos ração para roedores (Labina[®], Nestlé Purina PetCare Company[©]) e água *ad libitum*.

2. Delineamento experimental

Todas as etapas do processo experimental estão sumarizadas na figura 1.

2.1. Procedimentos cirúrgicos

Trinta dias após a chegada ao laboratório, aos 60 dias de vida, quando atingiram a idade reprodutiva, os animais foram sorteados em dois grupos, pelo método de sorteio de envelopes opacos e lacrados, de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: grupo O (ooforectomia) (n=40) e grupo S (cirurgia *sham*) (n=40).

O procedimento operatório de ooforectomia foi realizado após anestesia intraperitoneal, com 30 mg/kg de pentobarbital sódico 3%, e tricotomia dorsolateral, logo abaixo da última costela, bilateralmente. Os animais foram então submetidos à assepsia regional com água e sabão, antissepsia com solução aquosa 0,2% de clorexidina (Riohex, Rioquímica[®]) e posicionados em mesa cirúrgica, em decúbito lateral. Foi realizada uma incisão transversal na pele com, aproximadamente, 1,5 centímetros de comprimento, entre a última costela e a articulação coxofemoral. A cavidade peritoneal foi exposta, ultrapassando-se o plano muscular por divulsão, permitindo-se o acesso ao ovário envolto em tecido adiposo (figura 2a). Procedeu-se à ligadura do ovário, com fio de algodão 3.0 (Paramed[®]), e secção do mesmo distalmente à ligadura (figura 2b). A musculatura e a pele foram aproximadas com fio Mononylon^{*} 3-0 (Ethicon[®]), repetindo-se os mesmos procedimentos no lado contralateral, para a retirada do outro ovário.

Os animais do grupo S foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos, com exceção dos tempos cirúrgicos de ligadura e secção dos ovários.

2.2. Administração das substâncias

Trinta dias após os procedimentos cirúrgicos, aos 90 dias de vida, após novo sorteio, os grupos O e S foram divididos em quatro subgrupos, de acordo com a administração, intraperitoneal, de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) (AclastaTM, Novartis[®] Biociências S.A.) ou água destilada (AD), completando-se os grupos: OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) e SAD (n=20).

Durante todo o período de experimento, os animais foram pesados mensalmente.

2.3. Eutanásia dos animais (Momentos 1 e 2)

Os sacrifícios foram realizados nove e 12 meses após a administração das substâncias (Momentos 1 e 2), quando dez animais de cada grupo foram aleatoriamente sacrificados com dose letal, intraperitoneal, de 80mg/kg de pentobarbital sódico 3%, tendo seus fêmures direitos desarticulados, na região proximal (quadril) e distal (joelho), com a retirada de todas as partes moles (músculos, tendões e ligamentos).

As peças anatômicas foram envolvidas em gaze embebida em soro fisiológico 0,9%, embaladas em papel alumínio, identificadas e guardadas em *freezer*, a uma temperatura controlada de -20°C, por 24 horas, até a realização dos ensaios mecânicos.

3. Análise Mecânica

Para determinação das propriedades mecânicas dos fêmures, foram realizados ensaios de compressão axial, utilizando-se a Máquina Universal de Ensaio Mecânico EMIC[®], modelo DL 10.000, com precisão de $\pm(0,018 + F/3700)$ kN, apurada dentro das especificações das normas ABNT NBR NM ISO

7500-1:2004 e ABNT NBR 6674:1999. A máquina trabalha em conjunto com um microcomputador, em ambiente *Windows*[™] 2000, utilizando o programa Mtest[®] (DDL, Minnesota – USA) para o controle gráfico e aferição dos resultados.

Doze horas antes do ensaio mecânico, os fêmures foram descongelados e mantidos envoltos em compressas embebidas em soro fisiológico 0,9%. Em seguida, as extremidades distais das peças anatômicas foram fixadas, verticalmente, em recipientes de plástico, com capacidade de 35 ml, contendo 30 ml de resina acrílica auto-polimerizante (Jet[®]). Após 2 horas, as peças foram enviadas para os testes mecânicos.

O cutelo, cuja extremidade é côncava, foi posicionado axialmente ao fêmur, ajustando-se, perfeitamente, à sua cabeça (figura 3a). Uma vez iniciado o teste, o cutelo da máquina de ensaios realizava um movimento descendente, axialmente à cabeça femoral, a uma velocidade constante de 30mm/min, até o ponto de ruptura do corpo de prova (figura 3b), quando então, o programa Mtest[®] interrompia o ensaio, fornecendo, automaticamente, os resultados finais (figura 4).

A variável carga máxima (N) no momento da ruptura, bem como, o diagrama carga-deformação, eram informados, automaticamente, pelo programa. As demais variáveis: limite de elasticidade (N) e coeficiente de rigidez (N/mm), eram calculadas a partir da aplicação do método de Johnson⁽¹⁸⁾ aos resultados fornecidos pelo programa.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância, no modelo inteiramente casualizado, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas, utilizando-se, para tanto, os programas SigmaStat[®] versão

3.5.1.2 (Systat Software, Inc., Germany, 2006) e Minitab[®] versão 15.1.30.0 (Minitab Inc., 2007). O estudo das variáveis foi realizado por meio da técnica da análise de variância para um experimento fatorial do tipo 2x2x2 (três fatores, cada um com dois níveis):

- Tipo de procedimento cirúrgico: ooforectomia e cirurgia *sham*
- Substância administrada: ácido zoledrônico e água destilada
- Momento do sacrifício: nove e 12 meses

Os resultados dos procedimentos estatísticos foram apresentados em tabelas e gráficos, contendo medidas descritivas de tendência central (média) e variabilidade (desvio-padrão), com os respectivos indicadores de significância ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Com relação à substância administrada, a análise de variância mostrou ter havido aumento significativo da carga máxima e do limite de elasticidade, bem como, diminuição significativa do coeficiente de rigidez dos fêmures dos animais, nos quais foram administrados o ácido zoledrônico (grupos OAZ e SAZ), em relação àqueles que receberam água destilada (grupos OAD e SAD) (tabelas 1 a 3) (figuras 5 a 7).

Em se tratando do procedimento cirúrgico, verificou-se que, nos animais submetidos à ooforectomia, que fizeram uso de água destilada (grupo OAD), houve a diminuição significativa da carga máxima e do limite de elasticidade, além do aumento do coeficiente de rigidez, aos nove meses (Momento 1), em relação ao

grupo não ooforectomizado (grupo SAD). Esta diferença, contudo, não se manteve até os doze meses (Momento 2) (tabelas 1 a 3) (figuras 5 a 7).

Analisando-se o efeito do tempo, o estudo das variâncias demonstrou que os animais não-ooforectomizados, que fizeram uso de água destilada (grupo SAD), apresentaram carga máxima significativamente maior e coeficiente de rigidez menor aos nove meses (Momento 1) que aos doze meses (Momento 2). O limite de elasticidade não foi influenciado pelo momento de eutanásia (tabelas 1 a 3) (figuras 5 a 7).

DISCUSSÃO

A maioria dos bisfosfonatos apresenta um efeito bastante satisfatório no tratamento de diversas doenças que cursam com alta remodelação óssea, contudo, os efeitos adversos oriundos destas drogas, principalmente gastrointestinais, acabam por diminuir, em larga escala, a adesão dos pacientes aos tratamentos⁽¹⁹⁻²³⁾. O osso do tipo trabecular é o principal sítio de ação da droga, mantendo a espessura e a densidade de suas conexões, e por conseguinte, aumentando a resistência às fraturas^(16,24).

Pode-se dizer que há três propriedades mecânicas, extremamente importantes, acerca do tecido ósseo: a resistência óssea que, rudemente, traduz a quantidade de cálcio no tecido, sendo determinada pela carga máxima (N); a rigidez, que representa a fragilidade do material, sendo determinada pelo coeficiente de rigidez (N/mm); e o limite de elasticidade, que se caracteriza pelo limite no qual ocorre o desarranjo estrutural irreversível da matéria, sem a possibilidade de o corpo retornar à sua forma original. Estas propriedades somente podem ser estudadas

experimentalmente, pela observação do comportamento do osso quando submetido à forças de carregamento^(18,25). Neste estudo, apesar da alta qualidade do equipamento utilizado, que confere grande precisão aos resultados, deve-se considerar que o mesmo foi desenvolvido para testes de materiais isotrópicos (metais, por exemplo), enquanto que materiais biológicos são de natureza viscoelástica (estruturas compostas por diferentes substâncias, incluindo fluídos, com múltiplas formas de arranjo). Resultados obtidos em qualquer investigação deste tipo, não são absolutos, mas os possíveis diante da limitação do método^(18,26).

A carga máxima, definida como a máxima carga suportada pelo corpo até sua ruptura, foi determinada, automaticamente, pelo programa, sendo representada pelo ponto mais alto da curva do diagrama carga x deformação (figura 4 – linhas vermelhas). A análise desta variável é um ponto fundamental no estudo biomecânico de qualquer material. Neste estudo, a região de interesse (*ROI*) escolhida, o fêmur proximal, é uma região altamente afetada pela osteoporose, devido à elevada concentração de osso trabecular^(27,28). O aumento significativo da carga máxima, nos grupos que fizeram uso do ácido zoledrônico (OAZ e SAZ), pode ser explicado pela provável inibição do sistema osteoclástico^(29,30), que impediu a instalação do processo osteoporótico, mesmo nos grupos ooforectomizados (OAZ). Em estudos biomecânicos semelhantes, do mesmo autor do presente estudo, realizados em regiões ósseas de menor concentração de osso trabecular, como a diáfise tibial, os ensaios compressivos apresentaram valores não significantes⁽³¹⁾. A privação hormonal, causada pela ooforectomia bilateral, provoca a perda de massa óssea, com a consequente diminuição da carga máxima suportada⁽³²⁻³⁵⁾. Neste estudo, mesmo os animais submetidos à ooforectomia (grupo OAZ), quando sob o efeito do

ácido zoledrônico, tiveram suas cargas máximas igualadas ao comportamento mecânico dos grupos não-ooforectomizados (grupo SAZ) (tabela 1).

O limite de elasticidade é o extremo, considerado seguro, que o corpo de prova suporta antes da ocorrência de alguma deformação plástica, ou seja, uma deformação, ou desarranjo, irreversível em sua microestrutura, que não permitirá ao mesmo, retornar à sua dimensão e forma iniciais. É uma variável caracterizada pelo último ponto pertencente à fase reta (fase elástica) da curva “carga x deformação” (figura 4 – linha verde). Trata-se de uma variável pouco pesquisada e, conseqüentemente, poucos são os estudos com os quais se possam realizar alguma comparação. Neste estudo, o ácido zoledrônico agiu aumentando os valores dos limites de elasticidade máximos, aumentando, assim, a zona de segurança na qual a microestrutura óssea manteve-se intacta e dentro dos limites elásticos de deformação^(18,25) (tabela 2). A região de interesse (ROI) escolhida, com elevada concentração de osso trabecular, pode ter influenciado positivamente os resultados⁽³¹⁾.

O coeficiente de rigidez que, juntamente com a carga máxima, constitui-se em um dos principais parâmetros de avaliação biomecânica, é indicativo da estabilidade, ou rigidez, do material, sendo obtido da relação entre a carga aplicada e a deformação do corpo. O aumento da rigidez deve ser interpretado como a capacidade do corpo romper-se com menor deformação, típica dos materiais frágeis como o vidro. O coeficiente de rigidez é calculado a partir da reta da fase elástica, do diagrama carga-deformação, que vai até o limite de elasticidade (figura 4 – linhas amarelas). O ácido zoledrônico diminuiu o coeficiente de rigidez em todos os grupos, ou seja, diminuiu a rigidez femoral, tornando-os mais dúcteis, e, conseqüentemente, menos propensos a fraturas. Em estudo semelhante, em tíbias humanas de

diferentes idades, Burstein *et al.*⁽³⁶⁾ concluíram que a resistência (carga máxima) era semelhante nas duas idades (jovem e idoso), contudo, o osso “velho” era mais “quebradiço”, característica de materiais “frágeis”, e, portanto, com maior rigidez. A privação hormonal tende a aumentar o coeficiente de rigidez, tornando o osso mais frágil, ou quebradiço, contudo, no presente estudo, à semelhança dos resultados de outros autores^(34,37,38), o ácido zoledrônico conseguiu manter e, até mesmo, diminuir o coeficiente de rigidez ósseo dos animais ooforectomizados (grupo OAZ), em níveis semelhantes aos dos não-ooforectomizados (grupo SAZ). Pode-se inferir que a droga tenha mantido a integridade óssea de maneira absoluta, ou seja, orgânica e inorganicamente, o que explicaria a diminuição do coeficiente de rigidez femoral.

CONCLUSÕES

O ácido zoledrônico administrado intraperitonealmente, na concentração de 0,1mg/kg, aumentou, de maneira significativa, a carga e o limite de elasticidade, diminuindo, o coeficiente de rigidez da região proximal de fêmures de ratas ooforectomizadas, após nove e doze meses de observação.

REFERÊNCIAS

1. Meirik O, Rowe PJ. Research on fertility regulation. Safety and efficacy of existing methods of fertility regulation. In: WHO - World Health Organization. Annual technical report 1998. Geneva: WHO Press, 1999. p. 151-69.
2. Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, Smith TS, Cockman MD et al. Three-Dimensional Microimaging (MRMI and mCT), Finite Element Modeling, and

Rapid Prototyping Provide Unique Insights Into Bone Architecture in Osteoporosis. *Anat Rec (New Anat)* 2001; 265: 101–10.

3. OMS/WHO – World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. [WHO technical report series, n° 916]. Geneva: WHO Press, 2003. p. 129-32.
4. Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B *et al*. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42(6): 343-54.
5. Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 392-401.
6. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285: 785-95.
7. Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of bisphosphonate (icandronate) on fracture healing of long bones in rats. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 969-79.
8. Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 1228-36.
9. Wenzel C, Bartsch R, Hussian D, Pluschnig U, Locker GJ, Sevela U *et al*. Zoledronate in a patient with pamidronate refractory hipercalcemia syndrome. *Support Care Cancer* 2004; 12: 678-81.
10. Amanat N, Brown R, Bilston LE, Little DG. 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* 2005; 23: 1029-34.

11. Takahashi M, Wehrli FW, Wehrli SL, Hwang SN, Lundy MW, Hartke J *et al.*
Effect of prostaglandin and bisphosphonate on cancellous bone volume and structure in the ovariectomized rat studied by quantitative three-dimensional nuclear magnetic resonance microscopy. *J Bone Miner Res* 1999; 14(5): 680-9.
12. Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 1991; 6(4): 339-46.
13. Pataki A, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WSS. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat Rec* 1997; 249: 458-68.
14. Cheer SM, Noble S. Zoledronic acid. *Drugs* 2001; 61(6): 799-807.
15. Glatt M, Pataki A, Evans GP, Hornby SB, Green JR. Loss of vertebral bone and mechanical strength in estrogen-deficient rats is prevented by long-term administration of zoledronic acid. *Osteoporos Int* 2004; 15(9): 707-15.
16. Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova* 2005; 28(2): 274-80.
17. Wise LM, Waldman SD, Kasra M, Cheung R, Binnington A, Kandel RA *et al.*
Effect of zoledronate on bone quality in the treatment of aseptic loosening of hip arthroplasty in the dog. *Calcif Tissue Int* 2005; 77: 367-75.
18. Chiaverini V. Resistencia à tração e resistência à compressão. In: *Tecnologia mecânica*. 2ª ed. Rio Janeiro: McGraw-Hill; 1986. p. 93-117.
19. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD *et al.*
Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in

- vitro and inhibition of bone resorption in vitro by nitrogen-containing bisphosphonates. JPET 2001; 296(2): 235-42.
20. Zehnder Y, Risi S, Michel D, Knecht H, Perrelet R, Kraenzlin M *et al.* Prevention of bone loss in paraplegics over 2 years with alendronate. J Bone Miner Res 2004; 19(6): 1067-74.
21. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med 2001; 344(19): 1434-41.
22. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK *et al.* Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. Results from a 3-year randomized clinical trial. JAMA 1999; 282(7): 637-45.
23. Yamk B, Turkay C, Atalar H. Hepatotoxicity induced by alendronate therapy. Osteoporos Int 2007; 18: 829-31.
24. Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. Support Carc Cancer 2007; 15: 197-202.
25. Frankel VH, Nordin M. Biomecânica do osso. In: Frankel VH, Nordin M. Biomecânica do sistema músculo-esquelético. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p.23-49.
26. Müller SS. Análise comparativa das propriedades mecânicas do ligamento da patela e do tendão calcâneo. Thesis, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 1998.

27. Buhl KM, Jacobs CR, Turner RT, Evans GL, Farrel PA, Donahue HJ. Age bone displays an increased responsiveness to low intensity resistance exercise. *J Appl Physiol* 2001; 90:1359-64.
28. Siffert RS, & Levy RN. Trabecular patterns and the internal architecture of bone. *Mt Sinai J Med* 1979; 48: 221-6.
29. Palacio EP, Jabob EM, Campi TB, Muller SS. O zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas. Estudo prospectivo e randomizado. *Acta Ortop Bras* 2010; 18:90-5.
30. Myburgh KM, Noakes TD, Rood M, Hough FS. Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. *J Appl Physiol* 1989; 66: 14-9.
31. Pereira FRA, Dutra RC, Olímpio TCR, Muller SS, Palacio EP. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas. Estudo prospectivo e randomizado. *Rev Bras Ortop* 2009; 44: 61-8.
32. Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen K, Zhang H. Alteration in the mechanical competence and structural properties in the femoral neck and vertebrae of ovariectomized rats. *J Bone Miner* 1999; 14: 616-23.
33. Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J. Ovariectomy – induced bone loss can affect by different intensities of treadmill running in rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 441-8.
34. Sitta MC. Efeitos do treinamento físico com corrida ou levantamento de peso sobre o envelhecimento ósseo de ratos Wistar. [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.
35. Giavaresi G, Terlizzi E, Gnudi S, Cadossi R, Aldenni N, Fini M, Rocca, M, Giardino R. Discriminant capacity of quantitative ultrasound versus dual X-ray

absortiometry to determine cancelous bone loss in ovariectomized rats. Bone 2000; 26: 297-303.

36. Burstein AH, Reilly DT, Martins M. Aging of bone tissue: Mechanical properties. J Bone Joint Surg 1976; 58A, p.82-8.

37. Guo XE & Goldstein AS. Vertebral trabecular bone microscopic tissue elastic modulus and hardness do not change in ovariectomized rats. J Orthop Res. 2000; 18:333-6.

38. Carvalho DCL, Cliquet A. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. Acta Ortop Bras 2003; 11: 17-24.

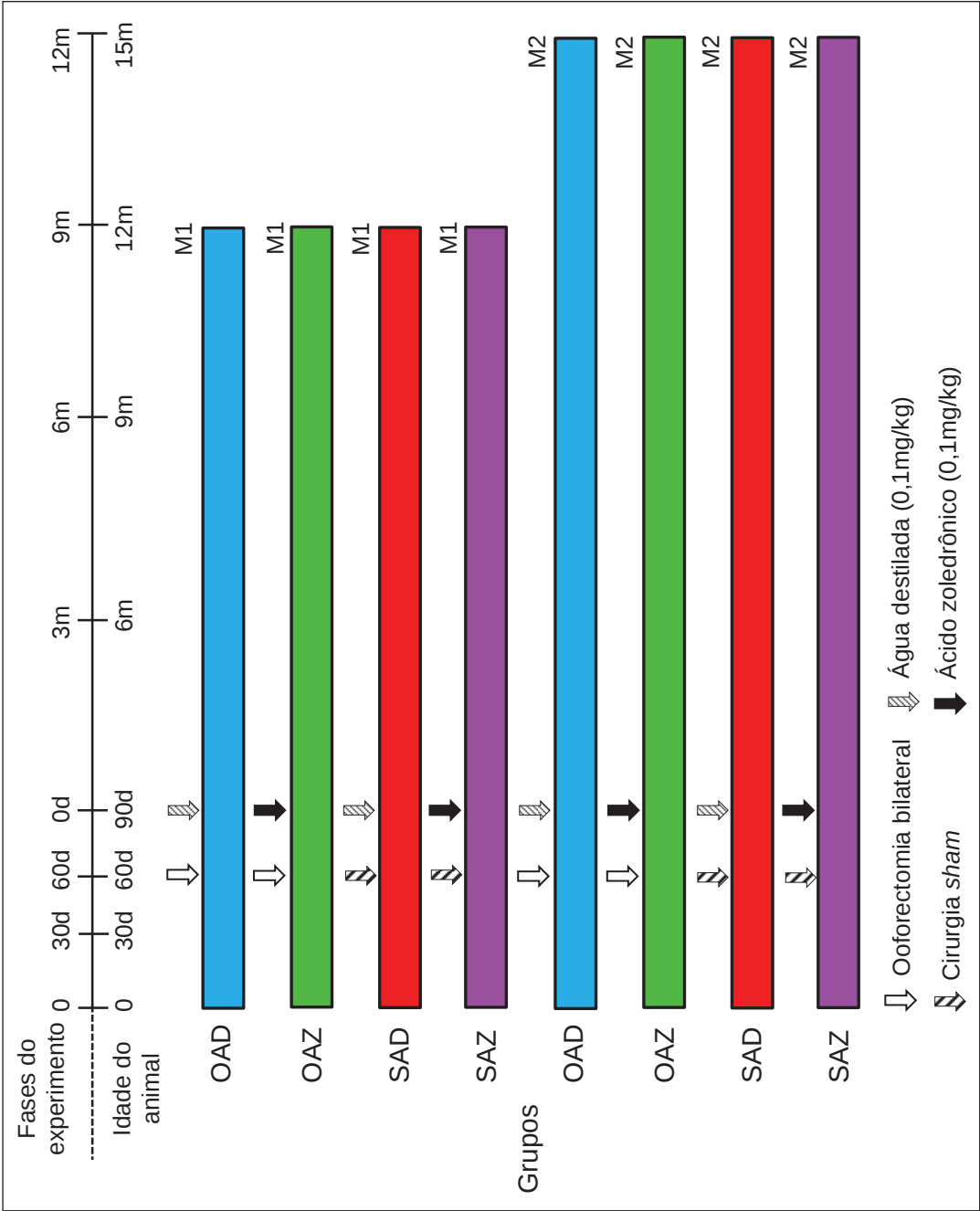


Figura 1 – Sumário das fases do experimento (linha do tempo).



Figura 2a – Aspecto do ovário, em meio ao tecido adiposo, previamente à sua ligadura e secção.



Figura 2b – Aspecto da secção do ovário, distalmente à sua ligadura.

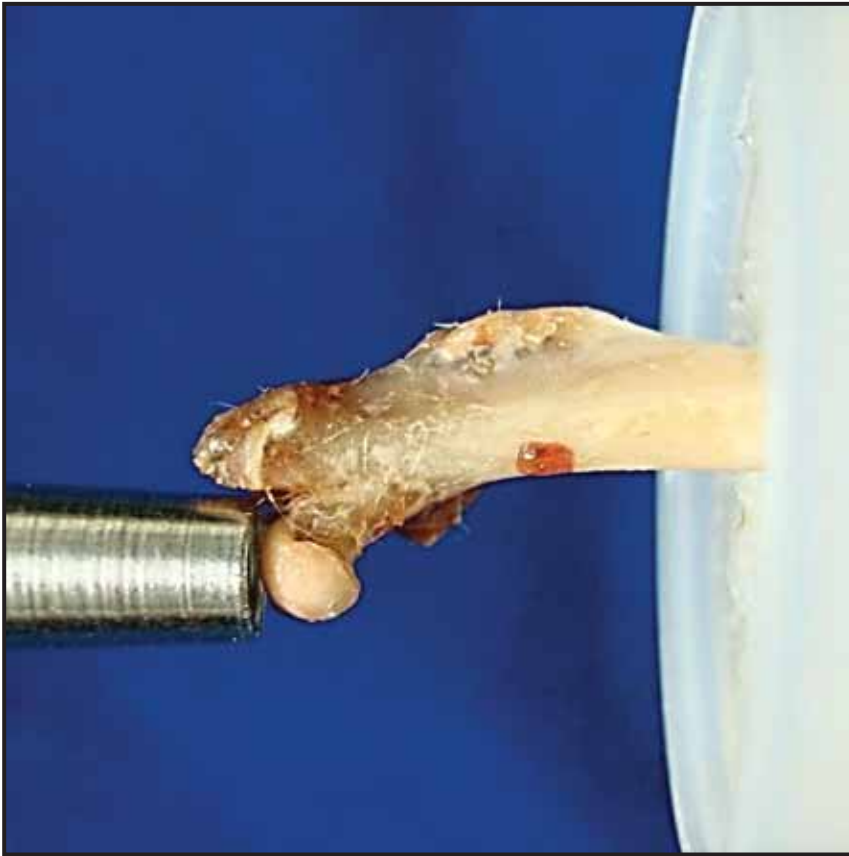


Figura 3a – Detalhe do corpo de prova e do cutelo, previamente ao início do ensaio mecânico.



Figura 3b– Detalhe do corpo de prova após a realização do ensaio mecânico e a ruptura do corpo de prova.

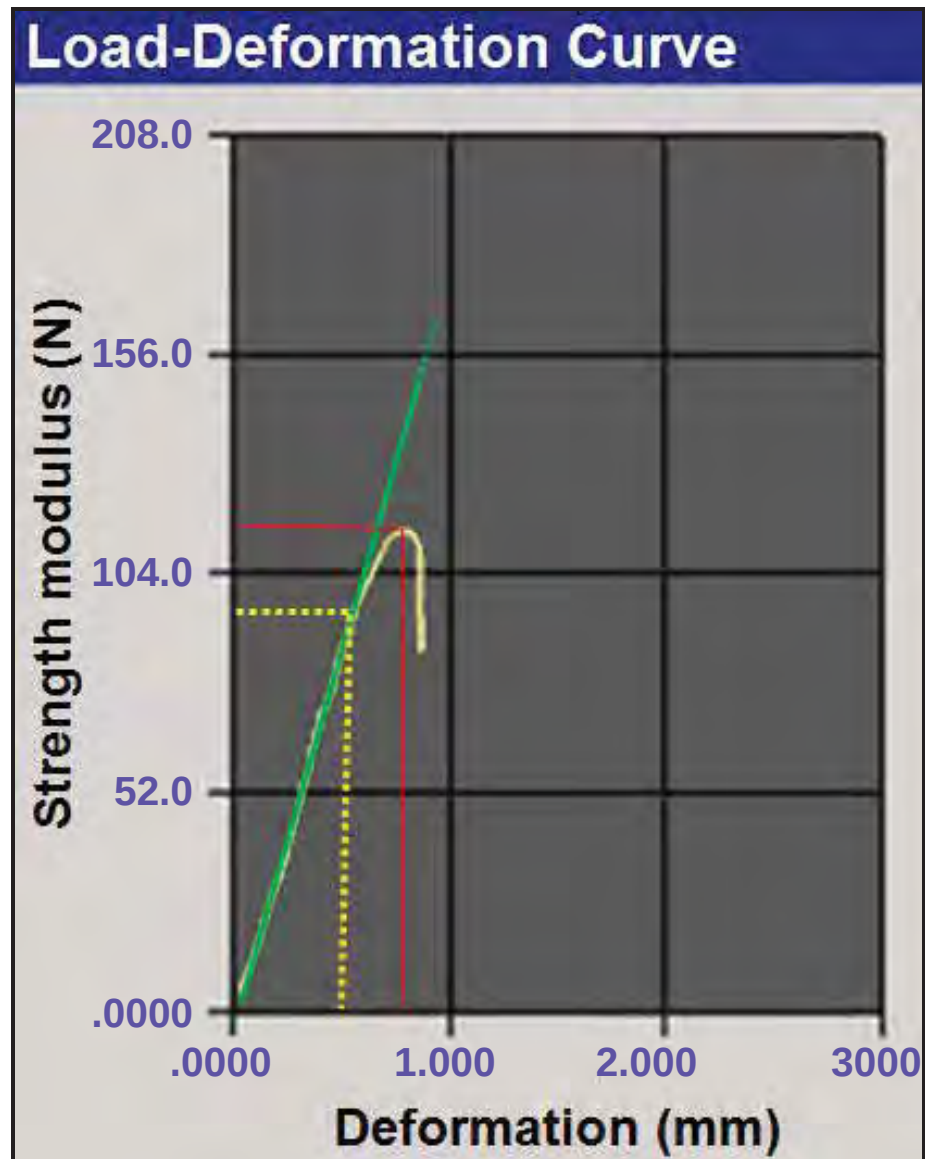


Figura 4 – Diagrama carga-deformação, obtido após o ensaio mecânico.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão da carga máxima (N), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	124,2 ± 12,1	112,6 ± 8,9
	Ácido Zoledrônico	OAZ	141,4 ± 13,1	138,7 ± 12,4
			† p=0,003	
			† p<0,001	
			* p=0,002	
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	140,0 ± 10,6	118,4 ± 10,5
	Ácido Zoledrônico	SAZ	149,7 ± 14,8	151,1 ± 10,6
			† p=0,001	
			‡ p<0,001	
			† p<0,001	

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

‡ Diferença significativa entre o momento de eutanásia.

† Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

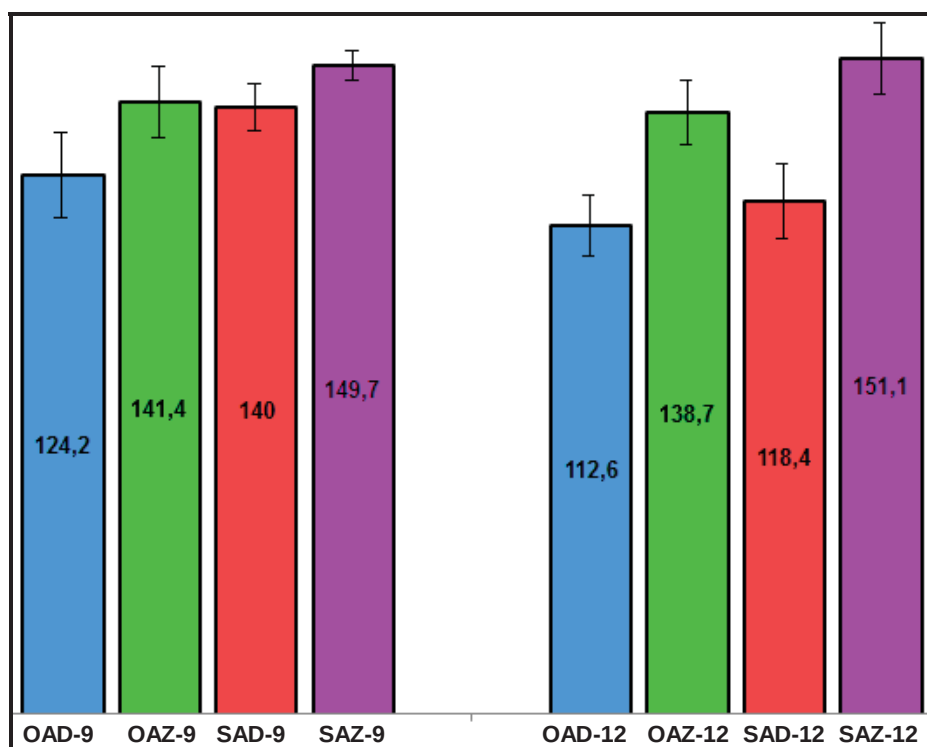


Figura 5 – Médias e desvios-padrão da carga máxima (N) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão do limite de elasticidade (N), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	113,0 ± 11,4	105,8 ± 8,9
	Ácido Zoledrônico	OAZ	129,7 ± 13,0	119,8 ± 14,1
			p=0,01	
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	125,3 ± 9,5	112,6 ± 9,2
	Ácido Zoledrônico	SAZ	137,1 ± 15,3	124,6 ± 16,8
			p=0,02	
			p=0,04	

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

† Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

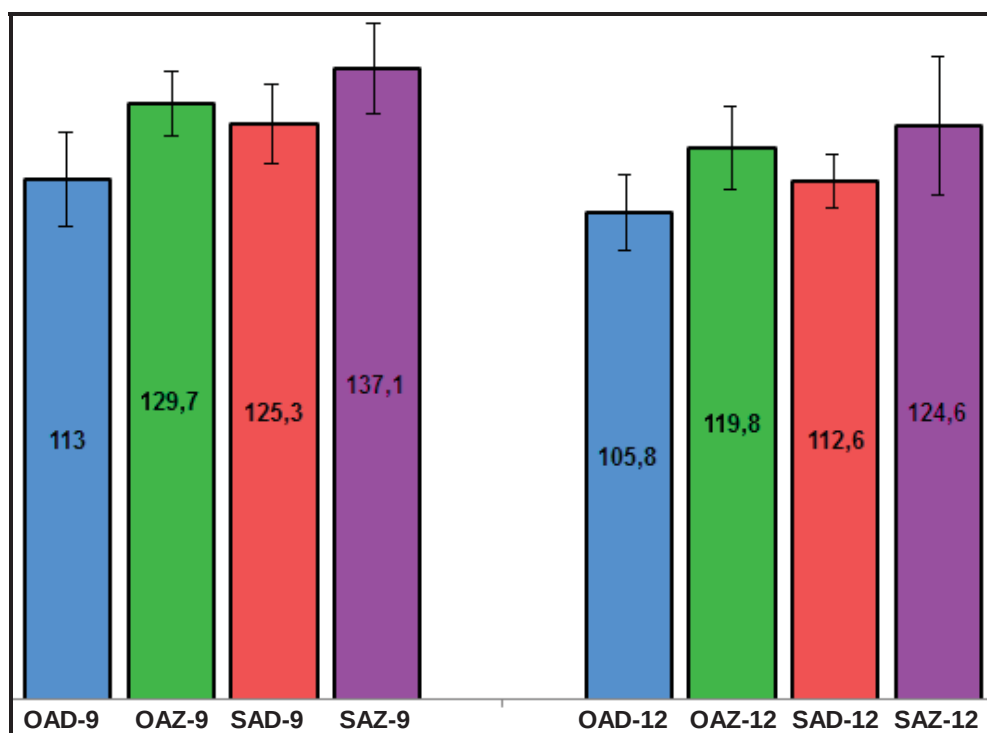


Figura 6 – Médias e desvios-padrão do limite de elasticidade (N) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão do coeficiente de rigidez (N/mm), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	214,2 ± 28	236,2 ± 32,7
	Ácido Zoledrônico	OAZ	158,2 ± 11	176,4 ± 6,7
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	171,7 ± 15,1	219,1 ± 10,8
	Ácido Zoledrônico	SAZ	130,1 ± 19,3	153,4 ± 23,9

^{*} p<0,001 (entre OAD e OAZ)
[†] p<0,001 (entre M1 e M2)
[‡] p<0,001 (entre SAD e SAZ)

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

† Diferença significativa entre o momento de eutanásia.

‡ Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

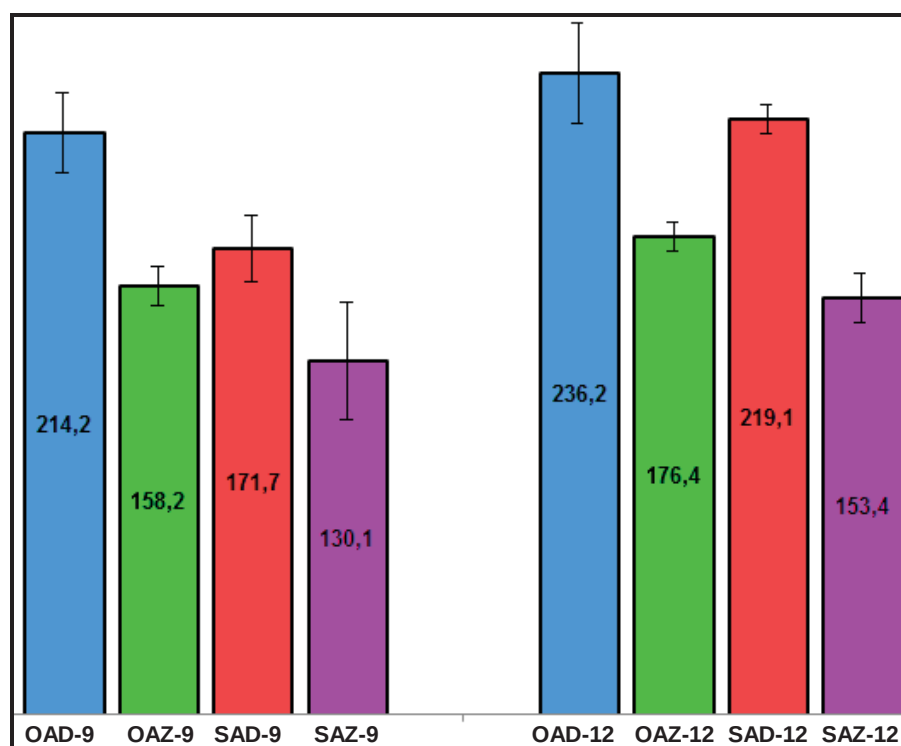


Figura 7 – Médias e desvios-padrão do coeficiente de rigidez (N/mm) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

*IV. Artigo Original 3**

* Padronizado de acordo com as normas para publicação na revista

The Journal of Bone and Joint Surgery [Br]

EFEITOS MICROTOMOGRÁFICOS DO ÁCIDO ZOLÊDRÔNICO SOBRE OS FÊMURES DE RATAS OOFORECTOMIZADAS

RESUMO

Objetivo: Investigar as repercussões microtomográficas do ácido zoledrônico em fêmures de ratas ooforectomizadas, após nove e doze meses de administração da droga. **Métodos:** Foram estudadas, aleatória e prospectivamente, 80 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Com 60 dias de vida, os animais foram sorteados em dois grupos, de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: ooforectomia bilateral (grupo O) (n=40) e cirurgia placebo (*sham*) (grupo S) (n=40). Após trinta dias de pós-operatório, os animais foram sorteados em quatro grupos, de acordo com a administração intraperitoneal de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) ou água destilada (AD): OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) e SAD (n=20). Os animais foram sacrificados nove e doze meses após a administração das substâncias, tendo seus fêmures esquerdos retirados e analisados microtomograficamente. Foram realizadas imagens microtomográficas tridimensionais da região de interesse, localizada na região intertrocantérica femoral, analisando-se as variáveis: volume ósseo (mm^3), número de trabéculas (mm^{-3}), distância intertrabecular (mm) e diâmetro trabecular (mm). **Resultados:** O ácido zoledrônico aumentou, significativamente, o volume ósseo, o número de trabéculas e o diâmetro trabecular das peças anatômicas, diminuindo, de igual maneira, a distância intertrabecular entre as mesmas. A ooforectomia diminuiu, significativamente, o volume ósseo, o número de trabéculas e o diâmetro trabecular, aumentando a distância intertrabecular dos fêmures. Quanto ao efeito do tempo,

verificou-se a diminuição significativa do volume ósseo, do número de trabéculas e do diâmetro trabecular, além do aumento significativo da distância intertrabecular, nos animais sacrificados aos 12 meses, comparativamente aos sacrificados aos nove meses. Conclusões: O ácido zoledrônico, na dose de 0,1mg/kg, aumentou, significativamente, o volume ósseo, o número de trabéculas e o diâmetro trabecular, diminuindo, a distância intertrabecular, em fêmures de ratas com osteoporose, causada por ooforectomia bilateral, após nove e doze meses de observação.

Descritores: Ácido zoledrônico; microtomografia; osteoporose; ooforectomia; rato.

ABSTRACT

Objective: To investigate the microtomographic effects of zoledronic acid in the femurs of female rats with osteoporosis due to bilateral oophorectomy, after a follow up period of nine and twelve months. Methods: Eighty female rats (*Rattus norvegicus albinus* – Wistar lineage) were randomly and prospectively assessed. Within 60 days, animals were randomized into two groups regarding the surgical procedure: bilateral oophorectomy (group O) (n=40) and sham surgery (group S) (n=40). When animals were 90 days old, groups O and S were randomized into four groups, according to the intraperitoneal administration of 0.1mg/kg of zoledronic acid (AZ) or distilled water (AD): OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) and SAD (n=20). Animals were euthanized at nine and twelve months after the intraperitoneal administration of the substances, and their left femurs removed and analyzed. The microtomographic investigation was performed on the intertrochanteric region, getting the bone volume (mm³), trabecular number (mm⁻³), trabecular separation (mm) and trabecular thickness (mm). Results: Zoledronic acid significantly increased the bone volume, the

trabecular number and the trabecular thickness, decreasing the trabecular separation of the femurs. The oophorectomy procedure itself, significantly decreased the bone volume, the trabecular number and the trabecular thickness, increasing the trabecular separation of the femurs. Concerning to the follow up period, there was a significant decrease of the bone volume, trabecular number and trabecular thickness, as well as the significant increase of the trabecular separation, in the animals euthanized at 12 months, compared to those euthanized at nine months. Conclusions: Zoledronic acid, at a dose of 0.1mg/kg, significantly increased the bone volume, the trabecular number and the trabecular thickness, significantly decreasing the trabecular separation in the femurs of female rats with osteoporosis caused by bilateral oophorectomy, after a follow up of nine and twelve months.

Key words: Zoledronic acid; microtomography; oophorectomy; osteoporosis; rats.

INTRODUÇÃO

Em 1999, a organização Mundial de Saúde publicou um artigo no qual antecipava a grave crise mundial de saúde, que se estabeleceria a partir do século 21, caso a osteoporose não fosse alvo da devida atenção e ações prioritárias em saúde. O estudo em questão prognosticava que 40% de todas as mulheres, em nível mundial, sofreriam algum tipo de fratura patológica, devido à osteoporose, assim como 13% da população masculina⁽¹⁾. Essas previsões se confirmaram em nossos dias.

Fisiologicamente, uma das mais graves alterações causadas pela osteoporose, além da diminuição da massa óssea propriamente dita, diz respeito às modificações microestruturais ocorridas no tecido ósseo. O osso esponjoso, o mais frequentemente acometido por esta enfermidade⁽²⁾, quando em equilíbrio

homeostático, é caracterizado pela distribuição uniforme de suas trabéculas, em se tratando da quantidade, espessura e distribuição espacial, ou conectividade das mesmas⁽³⁻⁵⁾.

Com a evolução da doença, as trabéculas tendem a diminuir, tanto em número, como em espessura, provocando o desarranjo arquitetônico do tecido ósseo, além da perda de sua conectividade; por conseguinte, há a diminuição progressiva de sua resistência à forças deformantes intrínsecas e extrínsecas. Este processo de deterioração leva à formação de microfraturas, também chamadas de *microcracks*, que, invariavelmente, culminam em fraturas patológicas, principalmente nas vértebras, quadris e punhos⁽⁶⁻⁹⁾.

O ácido zoledrônico, um aminobisfosfonato, cuja indicação primária é o tratamento de doenças com altas taxas de remodelação óssea, como tumores ósseos e a doença de Paget⁽¹⁰⁻¹³⁾, tem sido utilizado, muitas vezes empiricamente, no tratamento da osteoporose⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Embora esta seja uma droga conhecida há mais de uma década, poucos são os estudos que ponderam suas repercussões microarquitetônicas no tecido ósseo.

Considerando a fisiopatologia das fraturas osteoporóticas, as origens microscópicas das mesmas e a quase ausência de estudos, principalmente nacionais, sobre o tema, propomos um estudo cujo objetivo é a investigação dos efeitos do ácido zoledrônico sobre a arquitetura óssea trabecular, da região proximal de fêmures de ratas osteoporóticas, pelo método microtomográfico em 3D.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Recepção dos animais e adaptação ao ambiente experimental

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o nº 622/2007.

O tamanho amostral foi determinado previamente ao início do estudo, através de testes estatísticos específicos, levando-se em consideração os riscos α (5%) e β (20%), bem como a variabilidade das variáveis, chegando-se a um valor mínimo de 10 indivíduos por grupo.

Foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Campus Botucatu.

Os animais que, à recepção, contavam com 30 dias de vida, depois de clinicamente avaliados e pesados, foram alojados em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura controlada e ciclo de luz claro-escuro, sendo oferecido aos mesmos ração para roedores (Labina[®], Nestlé Purina PetCare Company[©]) e água *ad libitum*.

2. Delineamento experimental

Todas as etapas do processo experimental estão sumarizadas na figura 1.

2.1. Procedimentos cirúrgicos

Trinta dias após a chegada ao laboratório, aos 60 dias de vida, quando atingiram a idade reprodutiva, os animais foram sorteados em dois grupos, pelo método de sorteio de envelopes opacos e lacrados, de acordo com o procedimento cirúrgico a que seriam, imediatamente, submetidos: grupo O (ooforectomia) (n=40) e grupo S (cirurgia *sham*) (n=40).

O procedimento operatório de ooforectomia foi realizado após anestesia intraperitoneal, com 30 mg/kg de pentobarbital sódico 3%, e tricotomia dorsolateral, logo abaixo da última costela, bilateralmente. Os animais foram então submetidos à assepsia regional com água e sabão, antissepsia com solução aquosa 0,2% de clorexidina (Riohex, Rioquímica[®]) e posicionados em mesa cirúrgica, em decúbito lateral. Foi realizada uma incisão transversal na pele com, aproximadamente, 1,5 centímetros de comprimento, entre a última costela e a articulação coxofemoral. A cavidade peritoneal foi exposta, ultrapassando-se o plano muscular por divulsão, permitindo-se o acesso ao ovário envolto em tecido adiposo (figura 2a). Procedeu-se à ligadura do ovário, com fio de algodão 3.0 (Paramed[®]), e secção do mesmo distalmente à ligadura (figura 2b). A musculatura e a pele foram aproximadas com fio Mononylon^{*} 3-0 (Ethicon[®]), repetindo-se os mesmos procedimentos no lado contralateral, para a retirada do outro ovário.

Os animais do grupo S foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos, com exceção dos tempos cirúrgicos de ligadura e secção dos ovários.

2.2. Administração das substâncias

Trinta dias após os procedimentos cirúrgicos, aos 90 dias de vida, após novo sorteio, os grupos O e S foram divididos em quatro subgrupos, de acordo com a administração, intraperitoneal, de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) (Aclasta[™], Novartis[®] Biociências S.A.) ou água destilada (AD), completando-se os grupos: OAZ (n=20), OAD (n=20), SAZ (n=20) e SAD (n=20).

Durante todo o período de experimento, os animais foram pesados mensalmente.

2.3. Eutanásia dos animais (Momentos 1 e 2)

Os sacrifícios foram realizados nove e 12 meses após a administração das substâncias (Momentos 1 e 2), quando dez animais de cada grupo foram aleatoriamente sacrificados com dose letal, intraperitoneal, de 80mg/kg de pentobarbital sódico 3%, tendo os fêmures esquerdos desarticulados, na região proximal (quadril) e distal (joelho), com a retirada de todas as partes moles (músculos, tendões e ligamentos).

As peças anatômicas foram acondicionadas em tubos de ensaio, devidamente identificados e limpos, fixadas em solução de formaldeído 10%, e enviadas, imediatamente, para serem submetidas à análise microtomográfica.

3. Análise Microtomográfica

Para determinação das propriedades microtomográficas femorais, foram realizadas imagens tomográficas, utilizando-se o aparelho Feinfocus[®] (FXS-160.52). Este aparelho possui uma fonte ($< 5 \mu\text{m}$) emissora de raios-X que opera em sincronia com um fluoroscópio e uma câmara digital com dispositivo de carga acoplada ou CCD (*Charge-Coupled Device*). O sistema, após realizar cada uma das imagens, as envia a um microcomputador que as reconstrói, tomograficamente.

As imagens reconstruídas tiveram uma área circular de 16 mm^2 , localizadas nas regiões intertrocantéricas, definidas como região de interesse para o estudo ou, simplesmente, *ROI* (*Region of Interest*) (figuras 3a). As imagens microtomográficas, uma vez adquiridas, foram reconstruídas, automaticamente, pelo computador, em duas e, posteriormente, em três dimensões. Após a reconstrução das imagens em 3D, estas puderam ser manipuladas de forma a fornecer as variáveis desejadas:

- VO (mm^3) (volume ósseo);
- NT (mm^{-3}) (número de trabéculas por milímetros cúbicos);
- DI (mm) (distância intertrabecular);
- DT (mm) (diâmetro trabecular).

Para todas as análises, utilizou-se uma tensão de 40 kV, corrente de 0,1 mA, distância foco-amostra: 4,0 mm, e distância amostra-detector: 3,5 mm.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância, no modelo inteiramente casualizado, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas, utilizando-se, para tanto, os programas SigmaStat[®] versão 3.5.1.2 (Systat Software, Inc., Germany, 2006) e Minitab[®] versão 15.1.30.0 (Minitab Inc., 2007). O estudo das variáveis foi realizado por meio da técnica da análise de variância para um experimento fatorial do tipo 2x2x2 (três fatores, cada um com dois níveis):

- Tipo de procedimento cirúrgico: ooforectomia e cirurgia *sham*
- Substância administrada: ácido zoledrônico e água destilada
- Momento do sacrifício: nove e 12 meses

Os resultados dos procedimentos estatísticos foram apresentados em tabelas e gráficos, contendo medidas descritivas de tendência central (média) e variabilidade (desvio-padrão), com os respectivos indicadores de significância ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Com relação à substância administrada, a análise de variância mostrou ter havido o aumento significativo do volume ósseo, do número e do diâmetro das trabéculas, bem como, a diminuição significativa da distância intertrabecular nos fêmures dos animais que fizeram uso do ácido zoledrônico (grupos OAZ e SAZ), em detrimento daqueles que receberam água destilada (grupos OAD e SAD) (tabelas 1 a 4) (figuras 4 a 7).

Em se tratando do efeito do procedimento cirúrgico, verificou-se a diminuição significativa do volume ósseo, do número de trabéculas e do diâmetro trabecular, além do aumento significativo da distância intertrabecular, nos animais submetidos à ooforectomia, que receberam água destilada (grupo OAD), aos nove meses (Momento 1); esta diferença, contudo, não se manteve até os doze meses (Momento 2) (tabelas 1 a 4) (figuras 4 a 7).

Com relação ao efeito do tempo, verificou-se a diminuição significativa do volume ósseo, do número de trabéculas e do diâmetro trabecular, além do aumento significativo da distância intertrabecular, nos animais avaliados aos 12 meses (Momento 2), comparativamente aos avaliados aos nove meses (Momento 1) (tabelas 1 a 4) (figuras 4 a 7).

DISCUSSÃO

Os bisfosfonatos são drogas análogas ao pirofosfato que atuam, principalmente, no osso do tipo trabecular, mantendo, em menor ou maior grau, sua microarquitetura, aumentando, por conseguinte, sua resistência às fraturas^(17,18). Procurou-se neste estudo avaliar as principais características morfológicas trabeculares de fêmures de ratas osteoporóticas sob o efeito do ácido zoledrônico.

Sabe-se que a rigidez do tecido ósseo está intimamente relacionada à sua concentração de cálcio, contudo, outros fatores, de igual importância, devem ser considerados, como a distribuição, a organização e a conectividade das trabéculas que compõem o tecido, a chamada arquitetura óssea^(19,20). A microtomografia tridimensional é um processo de aquisição de imagens tomográficas, em nível microscópico, que possibilita a análise morfológica óssea, atribuindo valores precisos às variáveis de interesse, como o volume ósseo, a densidade, espessura e a distância entre as trabéculas.

Embora a conectividade entre as trabéculas seja, diretamente, dependente da massa óssea, aquela constitui-se no mais importante componente da rigidez óssea⁽²¹⁻²³⁾. A massa óssea, ou a quantidade de osso, é a variável osteoporótica mais analisada pelos inúmeros estudos existentes⁽²⁴⁻²⁸⁾, contudo, vários autores dão à microarquitetura óssea uma importância equivalente, ou maior, do que à massa óssea propriamente dita⁽²⁹⁻³³⁾.

As chamadas microfraturas (*microcracks*) são a origem das fraturas como as conhecemos, sendo causadas, principalmente, pelo desarranjo e degeneração das trabéculas ósseas. A diminuição progressiva da massa óssea, ou volume ósseo, pela osteoporose, traduz-se na diminuição da espessura trabecular e aumento da distância entre as mesmas, o que culminará na diminuição real do número trabecular e, conseqüentemente, em fraturas. Frost⁽³⁴⁾, em 1960, foi o primeiro a associar as microfraturas, causadas pelo desarranjo morfológico ósseo, às macrofraturas em arcos costais de indivíduos após os 40 anos de idade; a partir de então, vários outros autores relataram os mesmos achados em idosos com fraturas femorais⁽³⁵⁻⁴⁰⁾.

Sabe-se que as alterações ósseas provocadas pelo déficit hormonal comprometem, mais intensamente, o osso trabecular, pela acentuada ação

osteoclástica sobre o mesmo^(41,42). Neste estudo observou-se que o ácido zoledrônico agiu positivamente, aumentando o volume ósseo femoral dos animais, assim como o número e a espessura de suas trabéculas, provavelmente por sua ação apoptótica sobre os osteoclastos.

Estudos demonstram que a apoptose dos osteoclastos, promovida pelo ácido zoledrônico, é causada pela inibição da enzima farnesil-difosfato (FPP) sintetase, que é a responsável pela produção de moléculas de colesterol, específicas e necessárias à função e à sobrevivência dos osteoclastos⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. Assim, uma vez que o mecanismo absorptivo ósseo, promovido pelos osteoclastos, é interrompido, pode-se também inferir que a manutenção e, em alguns casos, o aumento dos valores de algumas variáveis morfológicas analisadas, como o volume ósseo e o número de trabéculas (tabelas 1 e 2), pode ter ocorrido pela manutenção do mecanismo osteoblástico.

Os animais que fizeram uso de água destilada, não tiveram o efeito protetor, promovido pelo ácido zoledrônico, permaneceram à mercê dos efeitos osteoclásticos reabsortivos^(47,48).

CONCLUSÕES

O ácido zoledrônico administrado intraperitonealmente, na concentração de 0,1mg/kg, aumentou, de maneira significativa, o volume ósseo, o número e a espessura das trabéculas, diminuindo, a distância entre as mesmas, na região proximal de fêmures de ratas ooforectomizadas, após nove e doze meses de observação.

REFERÊNCIAS

1. Delmas PD, Fraser M. Strong bones in later life: luxury or necessity? *Bull World Health Organ* 1999; 77(5): 416-22.
2. Bouxsein ML, Jepsen KJ. Etiology and Biomechanics of Hip and Vertebral Fractures. In: Orwoll ES. *Atlas of Osteoporosis*. Philadelphia: Current Medicine, 2003. p. 166-72.
3. Seeman E, Delmas PD. Bone Quality – The material and Structural basis of Bone Strength and Fragility. *N Engl J Med* 2006; 354: 2250-61.
4. Hayes CW, Conway WF. Hyperparathyroidism. *Radiol Clin North America* 1991; 29: 85-96.
5. Bouxsein ML, Melton LJ, Riggs BL, Muller J, Atkinson EJ, Oberg AL et al. Age- and Sex-Specific Differences in the Factor of Risk for Vertebral Fracture: A Population-Based Study Using QCT. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1475-82.
6. Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Peterson JM et al. Population-Based Study of Age and Sex Differences in Bone Volumetric Density, Size, Geometry, and Structure at Different Skeletal Sites. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1945-54.
7. Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Oberg AL et al. Population-Based Analysis of the Relationship of Whole Bone Strength Indices and Fall-Related Loads to Age- and Sex-Specific Patterns of Hip and Wrist Fractures. *J Bone Miner Res* 2006; 21(2): 315-23.
8. Courtney AC, Wachtel EF, Myers ER, Hayes WC. Age-Related Reductions in Strength of the Femur Tested in a Fall-Loading Configuration. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77(3): 387-95.

9. Mosekilde L. The effect of modeling and remodeling on human vertebral body architecture. *Technology and Health Care* 1998; 6: 287-97.
10. Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of Bisphosphonate (Icandronate) on Fracture Healing of Long Bones in Rats. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 969-79.
11. Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 1228-36.
12. Wenzel C, Bartsch R, Hussian D, Pluschnig U, Locker GJ, Sevela U et al. Zoledronate in a patient with pamidronate refractory hypercalcemia syndrome. *Support Care Cancer* 2004; 12: 678-81.
13. Zehnder Y, Risi S, Michel D, Knecht H, Perrelet R, Kraenzlin M et al. Prevention of bone loss in paraplegics over 2 years with alendronate. *J Bone Miner Res* 2004; 19(6): 1067-74.
14. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344(19): 1434-41.
15. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. Results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* 1999; 282(7): 637-45.
16. Yamk B, Turkay C, Atalar H. Hepatotoxicity induced by alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2007; 18: 829-31.

17. Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova* 2005; 28(2): 274-80.
18. Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Carc Cancer* 2007; 15: 197-202.
19. Frankel VH, Nordin M. Biomecânica do osso. In: Frankel VH, Nordin M. *Biomecânica do Sistema Músculo-Esquelético*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 23-49.
20. Burstein AH, Reilly DT, Martens M. Aging of bone tissue: mechanical properties. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58(1): 82-6.
21. Goldstein SA, Goulet R, McCubbrey D. Measurement and significance of three-dimensional architecture to the mechanical integrity of trabecular bone. *Calcif Tissue Int* 1993; 53(Suppl 1): S127–S133.
22. Compston JE. Connectivity of cancellous bone: Assessment and mechanical implications. *Bone* 1994; 15(6): 463-66.
23. Jensen KS, Mosekilde L, Mosekilde L. A model of vertebral trabecular bone architecture and its mechanical properties. *Bone* 1990; 11(6): 417–23.
24. Brankin E, Mitchell C, Munro R. closing the osteoporosis management gap in primary care: a secondary prevention of fracture programme. *Curr Med Res Opin* 2005; 21(4): 475-82.
25. Siris ES, Chen YT, Abbott TA, Barrett-Connor E, Miller PD, Wehren LE et al. Bone Mineral Density Thresholds for Pharmacological Intervention to Prevent Fractures. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1108-12.
26. Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O. Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 2005; 16: 581-9.

27. Bonjour JP, Carrie AL, Ferrari S, Clavien H, Slosman D, Theintz G et al. Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Invest* 1997; 99: 1287-94.
28. Kanis JA, Melton J, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1137-1141.
29. Borah B, Dufresne TE, Cockman MD, Gross GJ, Sod EW, Myers WR et al. Evaluation of changes in trabecular bone architecture and mechanical properties of minipig vertebrae by three-dimensional magnetic resonance microimaging and finite element modeling. *J Bone Miner Res* 2000; 15(9): 1786-97.
30. Currey JD. *Bones: Structure and Mechanics*. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 2002. p. 1-378.
31. Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD. Identification of Osteopenic Women at High Risk of Fracture: The OFELY Study. *J Bone Miner Res* 2005; 20(10): 1813-9.
32. Boutroy S, Buxsein ML, Munoz F, Delmas PD. In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6508-15.
33. Nalla RK, Kruzic JJ, Kinney JH, Ritchie RO. Effect of aging on the toughness of human cortical bone: evaluation by R-curves. *Bone* 2004; 35(6): 1240-6.
34. Frost HM. Presence of microscopic cracks in vivo in bone. *Henry Ford Hosp Bull* 1960; 8: 27-35.
35. Mori S, Isa S, Kanaya F, Sato S, Ibaraki K, Burr DB et al. Microcrack distribution in human femoral heads. *Proceedings of the 6th International Congress on Bone Morphometry*, Lexington, KY 1992. p. A24.

36. Wenzel TE, Schaffler MB, Fyhrie DP. In vivo trabecular microcracks in human vertebral bone. *Bone* 1996; 19(2): 89-95.
37. Schaffler MB, Choi K, Milgrom C. Aging and matrix microdamage accumulation in human compact bone. *Bone* 1995; 17(6): 521-5.
38. Fazzalari NL, Vernon-Roberts B, Darracott J. Osteoarthritis of the hip. Possible protective and causative roles of trabecular microfractures in the head of the femur. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 216: 224-33.
39. Schaffler MB, Boyce TM, Lundin-Cannon KD, Milgrom C, Fyhrie DF. Age-related architectural changes and microdamage accumulation in the human femoral neck cortex. *Trans Orthop Res Soc* 1995; 20: 549.
40. Wenzel TE, Schaffler MB, Fyhrie DP. In vivo trabecular microcracks in human vertebral bone. *Bone* 1996; 19(2): 89-95.
41. Buhl KM, Jacobs CR, Turner RT, Evans GL, Farrel PA, Donahue HJ. Age bone displays an increased responsiveness to low intensity resistance exercise. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1359-64.
42. Siffert RS, Levy RN. Trabecular patterns and the internal architecture of bone. *Mt Sinai J Med* 1981; 48: 221-9.
43. Amanat N, Brown R, Bilston LE, Little DG. 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* 2005; 23: 1029-34.
44. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vitro by nitrogen-containing bisphosphonates. *JPET* 2001; 296(2): 235-42.

45. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1995;10:1478-1487.
46. Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts.
47. Palacio EP, Jabob EM, Campi TB, Muller SS. O zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas. Estudo prospectivo e randomizado. *Acta Ortop Bras* 2010; 18: 90-5.
48. Myburgh KM, Noakes TD, Rood M, Hough FS. Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. *J Appl Physiol* 1989; 66: 14-9.

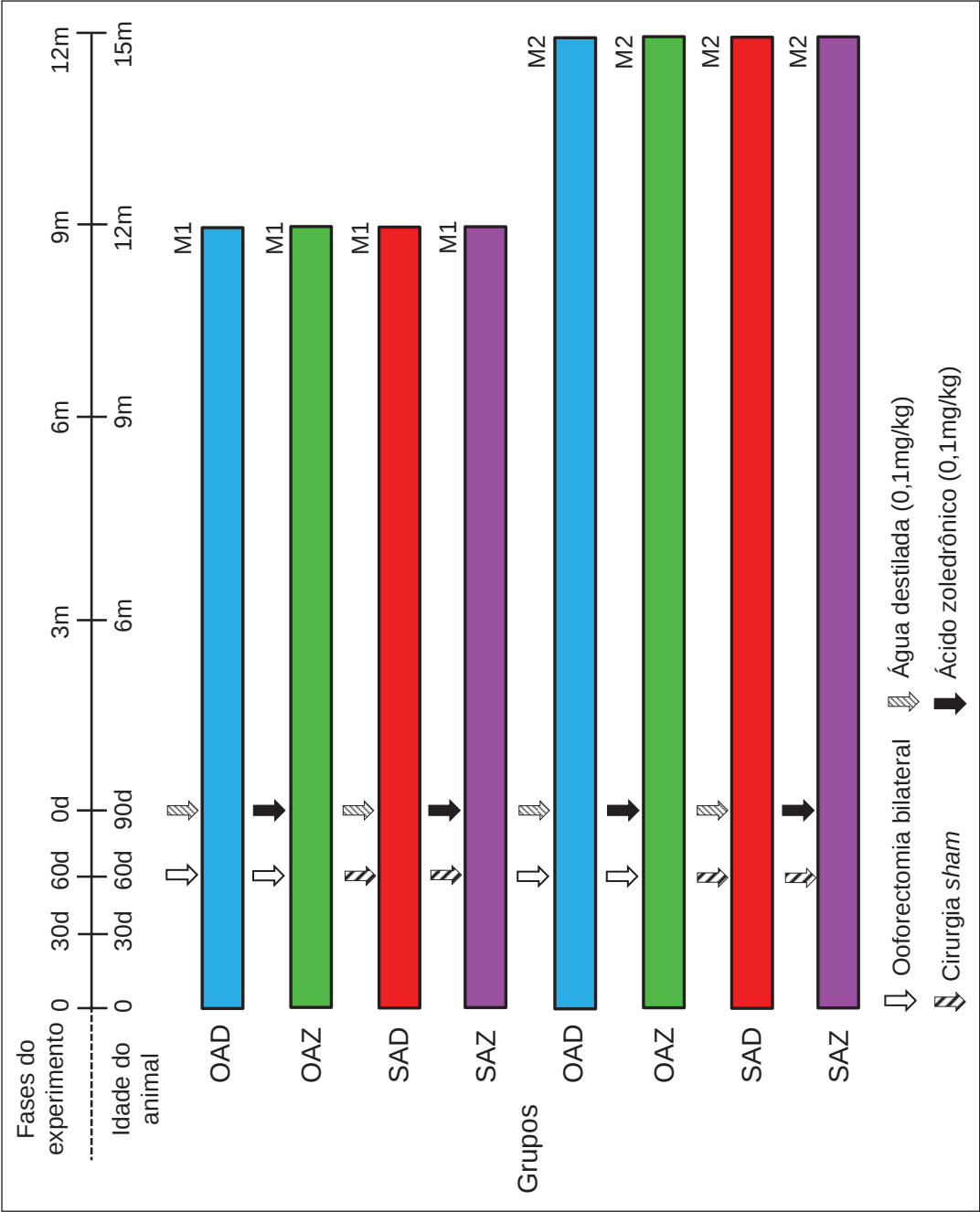


Figura 1 – Sumário das fases do experimento (linha do tempo).



Figura 2a – Aspecto do ovário, em meio ao tecido adiposo, previamente à sua ligadura e secção.



Figura 2b – Aspecto da secção do ovário, distalmente à sua ligadura.

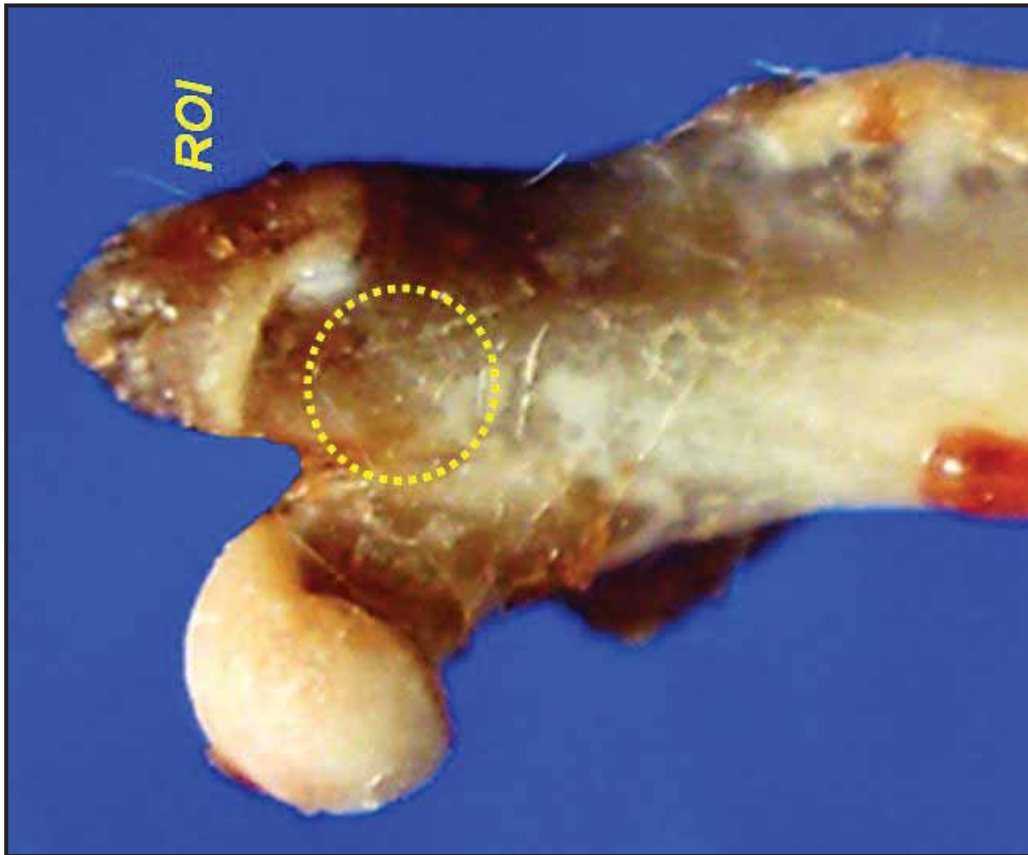


Figura 3a – Área de interesse (ROI) do ensaio microtomográfico.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão do volume ósseo (mm³), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	0,62 ± 0,02	0,41 ± 0,06
	Ácido Zoledrônico	OAZ	0,85 ± 0,04	0,62 ± 0,02
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	0,71 ± 0,02	0,45 ± 0,01
	Ácido Zoledrônico	SAZ	0,92 ± 0,06	0,64 ± 0,03

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.
 ‡ Diferença significativa entre o momento de eutanásia.
 † Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

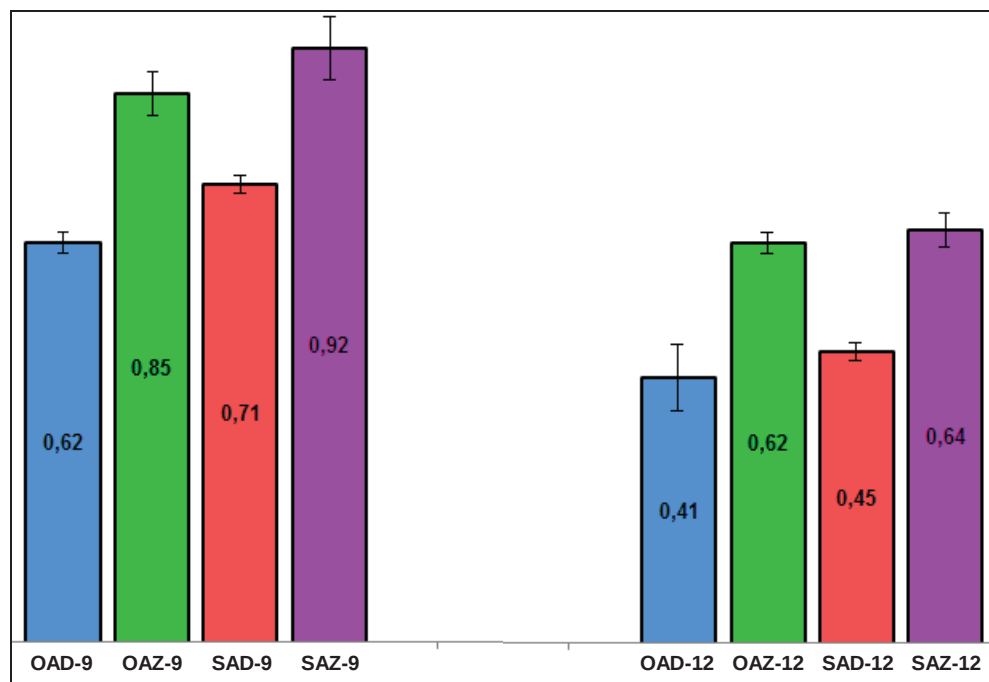


Figura 4 – Médias e desvios-padrão do volume ósseo (mm³) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão do número de trabéculas (mm^{-3}), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	2,99 ± 0,35	1,90 ± 0,25
	Ácido Zoledrônico	OAZ	4,71 ± 0,31	4,09 ± 0,23
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	4,05 ± 0,33	2,22 ± 0,33
	Ácido Zoledrônico	SAZ	5,54 ± 0,65	4,32 ± 0,36

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.
 ‡ Diferença significativa entre o momento de eutanásia.
 † Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

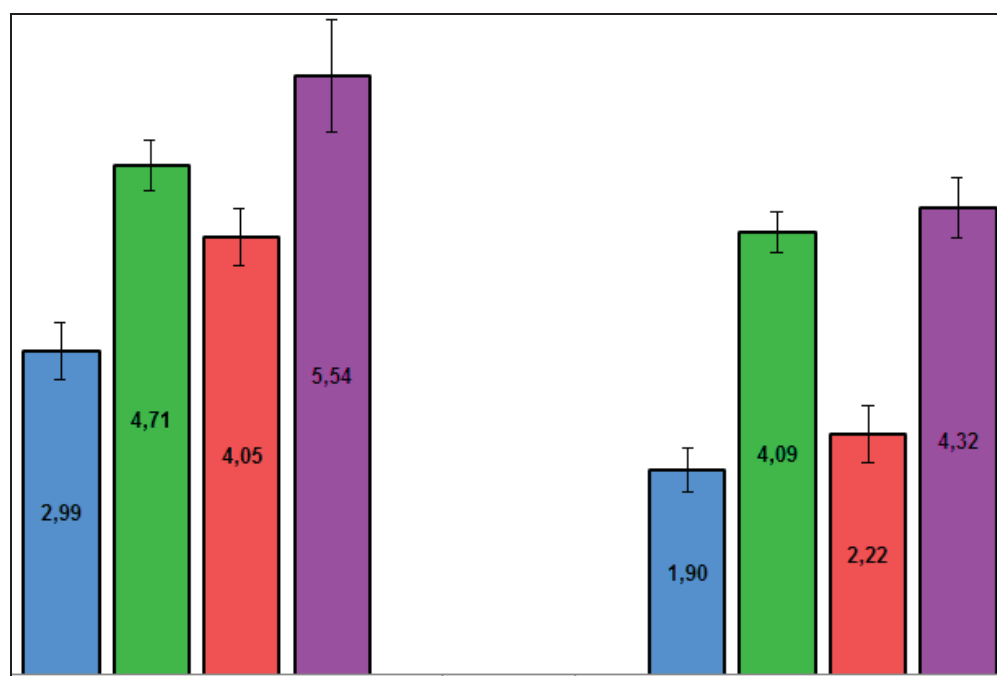


Figura 5 – Médias e desvios-padrão do número de trabéculas (mm^{-3}) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão da distância intertrabecular (mm), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	0,21 ± 0,06	0,31 ± 0,03
	Ácido Zoledrônico	OAZ	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,02
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	0,15 ± 0,03	0,29 ± 0,02
	Ácido Zoledrônico	SAZ	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,01

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

‡ Diferença significativa entre o momento de eutanásia.

† Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

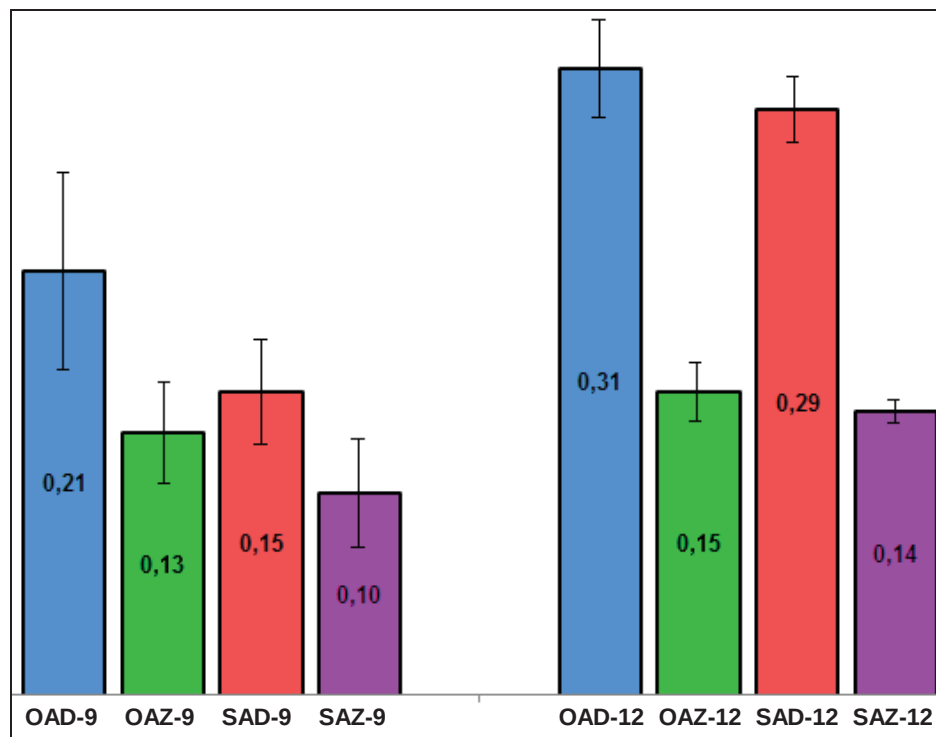


Figura 6 – Médias e desvios-padrão da distância intertrabecular (mm) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

Tabela 4 – Médias e desvios-padrão do diâmetro trabecular (mm), segundo o tipo de procedimento cirúrgico, substância administrada e momento de eutanásia.

Procedimento Cirúrgico	Substância Administrada	Grupo	Momento de Eutanásia	
			9 meses (M1)	12 meses (M2)
Ooforectomia	Água Destilada	OAD	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,01
	Ácido Zoledrônico	OAZ	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,02
Cirurgia Sham	Água Destilada	SAD	0,13 ± 0,02	0,07 ± 0,01
	Ácido Zoledrônico	SAZ	0,16 ± 0,06	0,15 ± 0,05

$\dagger$ p<0,001 (comparação entre M1 e M2)
 $\dagger$ p<0,001 (comparação entre OAD e OAZ)
 $\dagger$ p<0,001 (comparação entre SAD e SAZ)
 $\dagger$ p=0,04 (comparação entre OAZ e SAZ)
 $\dagger$ p=0,002 (comparação entre OAD e SAD)

* Diferença significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico.

‡ Diferença significativa entre o momento de eutanásia.

† Diferença significativa entre o tipo de substância administrada.

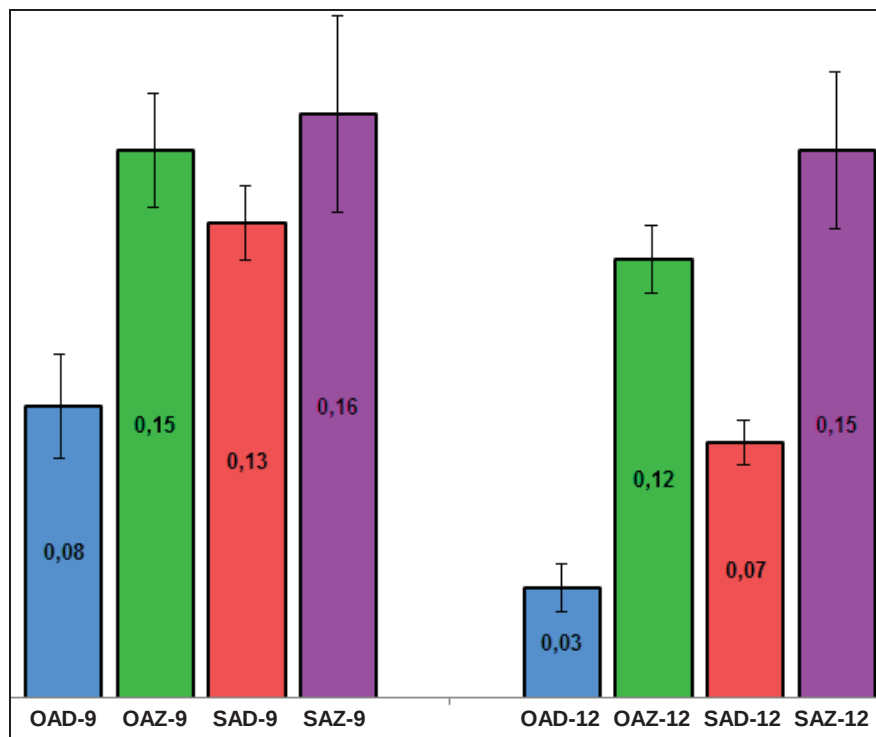


Figura 7 – Médias e desvios-padrão do diâmetro trabecular (mm) ao longo do experimento, segundo os grupos e momentos de sacrifício.

V. Considerações Finais

Este estudo teve como objetivos esclarecer as implicações do ácido zoledrônico sobre o tecido ósseo osteoporótico, sob diferentes perspectivas. Para tanto, procurou-se manter em foco, as graves e prementes consequências decorrentes desta enfermidade, conhecida há séculos.

Sem a pretensão de propor um novo tratado farmacológico sobre o ácido zoledrônico, ou enveredarmos pelos intrincados caminhos da Patologia Clínica sobre a osteoporose, arriscamo-nos a apontar e, dentro das limitações naturais de uma pesquisa experimental, equilibrar as opiniões mais conflitantes. Trata-se de uma tarefa Hercúlea encontrar pontos de convergência entre os dois temas: de um lado a osteoporose, conhecida e pesquisada desde antes de Cristo, com suas centenas de conceitos, apreciações e conclusões; de outro, o ácido zoledrônico, conhecido há pouco mais de uma década, com centenas de juízos e resultados contundentes. Dentre este universo de informações, muitas vezes contraditórias, pode-se identificar a reprodução sistemática, quase unânime, de uma opinião acerca da osteoporose: tempos difíceis se aproximam.

As fraturas patológicas por osteoporose caracterizam apenas uma, das muitas faces do problema. Há que se considerar não apenas no ônus financeiro dos sistemas de saúde, públicos e privados, mas, o altíssimo déficit previdenciário, que se originará do tratamento da enfermidade e, principalmente, de suas sequelas diretas.

Embora a Medicina do século XXI tenha uma característica muito mais preventiva que curativa, no Brasil, o conceito de profilaxia ainda não fixou raízes. Resta-nos, como última opção, a alternativa medicamentosa e, neste caso, o ácido zoledrônico assume posição de destaque. Esta droga, embora não seja a panaceia

que há muito esperávamos, preenche, com o perdão do trocadilho, os principais “vazios” deixados pela osteoporose.

Os resultados deste estudo demonstraram que o ácido zoledrônico conseguiu reverter os principais efeitos deletérios da osteoporose, sobre o tecido ósseo femoral. As degenerações ósseas, em suas múltiplas vertentes, principalmente densitométricas, biomecânicas e microestruturais, não foram páreas para a potência terapêutica do ácido zoledrônico, que obteve sucesso em revertê-las em sua totalidade. Algumas perguntas, contudo, que fogem aos objetivos iniciais desta pesquisa, devem ser feitas e, acima de tudo, respondidas. A principal delas relaciona-se com os efeitos, em longo prazo, da ausência da remodelação óssea, causada pela apoptose dos osteoclastos. Poder-se-ia intervir no ciclo fisiológico de renovação tecidual impunemente? A interrupção da remodelação óssea poderia, como seria de se esperar, levar ao “envelhecimento” tecidual e constituir-se, por si mesma, em uma nova causa de fraturas? Outra questão, que paira ainda sob densas névoas, diz respeito aos possíveis efeitos colaterais deste medicamento: a osteonecrose de mandíbula e, principalmente, casos de arritmias cardíacas, são reações adversas frequentemente relatadas pelos pacientes, dentro dos doze primeiros meses após a infusão da droga. Por outro lado, estudos sobre o tema são ainda poucos e com nível de evidência questionáveis. Que outros efeitos adversos estariam reservados aos pacientes em uso desta droga em longo prazo?

Dentro de um estudo experimental isolado, não pode haver lugar para a ambição de se extinguir o assunto, respondendo-se a todas as perguntas. Fazer ciência é um processo longo, contínuo e, acima de tudo, baseado em fatos. Embora este seja um processo exclusivamente racional, a humildade deve ter lugar assegurado, dentro do delineamento de qualquer pesquisa: por meio dela,

reconhecemos nossa incapacidade e ignorância, ainda que momentâneas, frente ao novo e ao desconhecido.

Nestas ocasiões, invariavelmente, são abertos espaços para novas perguntas e, conseqüentemente, novos pesquisadores.

VI. Anexos e Apêndices

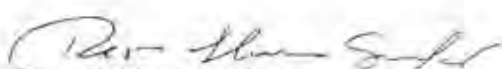
Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

	Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S. P. CEP 13.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 8802-6143 e-mail: secrefana_capelluppi@fmb.unesp.br		
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/98		Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

*CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 622 sobre o Projeto de Pesquisa
 "Influência do ácido zoledrônico no processo de remodelação óssea em ratas
 ooforectomizadas" a ser conduzido por de Evandro Pereira Palácio, orientado
 pelo Prof. Dr. Sérgio Swain Müller, está de acordo com os Princípios Éticos na
 Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação
 Animal (COBEA).*

Projeto de Pesquisa Aprovado em 28 de junho de 2.007

 Prof.ª Dr.ª Regina Helena G. Martins Presidente da CEEA	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA
--	---

Apêndice A – Registro da massa corporal (g) do grupo OAD ao longo do experimento.

Operação, subst. e n° rato	23/08/2007		24/05/2008										24/08/2008		
	24/07/2007 (cirurgia)	(admin. droga)	26/09/2007	24/10/2007	25/11/2007	23/12/2007	25/01/2008	25/02/2008	25/03/2008	25/04/2008	1° sacrifício		24/06/2008	25/07/2008	2. sacrifício
1	210	288	324	339	343	359	367	393	401	420	416				
2	193	294	312	321	354	345	349	342	338	341	350				
3	216	283	313	322	352	365	377	386	404	415	425				
4	220	302	324	342	361	381	384	403	412	430	421				
5	208	334	374	395	442	440	449	461	458	478	460				
6	233	306	318	342	384	388	390	389	386	400	407				
7	180	224	266	281	300	295	301	291	298	303	305				
8	172	234	252	261	280	276	287	281	295	291	287				
9	179	285	311	320	342	357	384	386	396	411	416				
10	201	286	324	338	351	345	347	349	359	368	367				
Ooforectomia Água Destilada															
11	203	288	311	317	326	332	345	346	352	361	353		388	388	381
12	180	268	265	294	308	310	316	315	316	309	301		303	302	365
13	184	248	278	292	326	343	357	355	357	365	357		374	356	362
14	197	300	336	350	380	389	407	401	403	405	397		414	391	368
15	183	252	275	302	317	312	317	310	311	300	292		307	317	386
16	186	286	323	332	354	364	372	372	366	381	373		378	377,5	377
17	188	251	295	317	332	356	373	383	387	401	393		421	414	371
18	196	271	292	304	318	323	346	341	354	361	353		367	362	357
19	205	278	313	323	328	349	353	370	377	379	371		375	376	366
20	187	273	286	285	300	300	298	304	301	310	302		308	348,5	389

Ooforectomia Agua Destilada

Apêndice B – Registro da massa corporal (g) do grupo OAZ ao longo do experimento.

Operação, subst. e n° rato	24/07/2007		23/08/2007		26/09/2007		24/10/2007	25/11/2007	23/12/2007	25/01/2008	25/02/2008	25/03/2008	25/04/2008	24/05/2008		24/06/2008	25/07/2008	24/08/2008
	(cirurgia)	(admin. droga)												1° sacrifício				2. sacrifício
21	200	268	305	321	350	366	386	383	396	404	396	372	387	389				
22	175	307	336	359	379	385	391	399	398	417	409	363	394	302				
23	242	330	367	388	428	434	460	474	497	525	517	443	391	339				
24	203	265	285	299	307	322	333	339	336	350	342	355	361	414				
25	183	276	305	323	340	339	326	344	347	354	346	357	371	312				
26	241	342	394	418	463	494	510	533	540	558	550	463	426	390				
27	208	328	365	388	429	449	471	488	468	488	480	501	481	408				
28	182	259	284	293	313	326	341	348	354	368	360	359	359	359				
29	192	263	278	308	327	350	370	373	379	400	392	399	393	387				
30	210	335	365	375	397	415	427	438	452	471	463	478	396	314				
31	182	260	288	293	307	313	314	310	316	321	323							
32	208	282	312	313	351	344	345	345	344	360	357							
33	181	298	336	347	373	384	393	393	396	369	359							
34	230	375	409	423	456	486	510	517	532	548	556							
35	201	286	314	338	360	366	388	388	401	412	415							
36	177	267	292	301	310	337	318	347	342	358	345							
37	200	274	294	301	308	312	311	319	315	272	286							
38	180	292	293	307	350	344	355	362	357	363	369							
39	194	273	295	309	336	358	363	377	383	400	390							
40	216	272	288	296	300	298	303	310	302	287	284							

Ooforectomia Ácido Zoledrônico

Apêndice C – Registro da massa corporal (g) do grupo SAD ao longo do experimento.

Operação, subst. e n° rato	23/08/2007		24/08/2008										24/08/2008	
	24/07/2007 (cirurgia)	(admin. droga)	26/09/2007	24/10/2007	25/11/2007	23/12/2007	25/01/2008	25/02/2008	25/03/2008	25/04/2008	1° sacrifício		2. sacrifício	
41	177	239	253	255	261	259	258	246	261	251	262			
42	245	297	316	348	371	375	387	398	394	402	414			
43	178	232	262	269	294	307	311	325	333	347	367			
44	200	247	273	288	307	310	333	330	337	345	362			
45	176	208	229	235	245	250	250	252	265	262	276			
46	202	245	316	257	267	267	290	295	287	286	289			
47	175	211	225	228	175	231	262	256	266	281	273			
48	233	262	277	289	243	298	314	328	344	350	246			
49	250	267	317	335	365	382	401	415	434	453	433			
50	198	257	258	273	296	322	341	363	383	394	377			
Sham Agua Destilada														
51	174	210	217	224	240	259	276	276	288	291	283	282	294	
52	200	224	234	246	249	258	260	274	279	286	278	290	271	
53	193	221	240	257	265	273	268	274	268	264	256	267	430	
54	156	186	182	205	212	213	218	222	222	223	215	265	301	
55	203	255	269	274	284	287	297	294	300	309	301	298	298	
56	208	263	275	288	314	334	355	363	369	384	376	355,5	316	
57	192	214	234	252	272	277	272	278	279	283	275	309	336	
58	201	261	281	307	314	314	319	326	313	310	302	315	353	
59	192	240	248	267	284	288	299	307	314	330	322	381,5	417	
60	154	215	249	263	264	278	283	287	285	281	273	292	357	

Sham Água Destilada

Apêndice D – Registro da massa corporal (g) do grupo SAZ ao longo do experimento.

Operação, subst. e n° rato	24/07/2007 (cirurgia)	23/08/2007 (admin. droga)	26/09/2007	24/10/2007	25/11/2007	23/12/2007	25/01/2008	25/02/2008	25/03/2008	24/05/2008			24/08/2008	
										25/04/2008	24/06/2008	25/07/2008		
61	212	265	289	296	308	308	326	311	310	291	283	284	290	306
62	177	235	257	250	268	269	264	266	262	259	251	257	263	321
63	199	240	278	286	314	327	341	357	378	409	401	428	433	301
64	210	240	247	260	280	271	279	280	286	293	285	293	261	230
65	213	241	263	281	296	306	306	312	311	302	294	305	301	337
66	209	250	277	299	316	323	325	329	329	329	321	313	314	435
67	207	244	269	279	296	297	307	324	321	331	323	338	323	309
68	231	271	277	281	299	301	308	315	316	333	325	350	351	357
69	197	239	283	297	334	339	356	377	389	403	395	408	413	417
70	195	252	271	286	302	316	324	350	354	369	361	341	336	331
Sham Acido Zoletrônico														
71	186	244	262	268	292	294	298	305	316	319	326			
72	169	193	214	235	242	253	272	257	272	279	279			
73	206	249	264	283	296	297	298	307	322	342	339			
74	201	230	249	259	275	277	282	280	284	280	281			
75	181	210	283	236	251	243	250	253	254	266	266			
76	190	248	276	290	314	322	341	355	356	376	369			
77	217	258	259	272	293	291	303	297	298	301	292			
78	209	260	275	291	299	306	307	318	316	325	328			
79	187	258	278	281	309	320	338	347	351	366	362			
80	181	241	262	264	275	278	289	283	293	294	301			

Sham Ácido Zoledrônico

Apêndice E – Registro dos valores densitométricos (mmAl) dos grupos ao longo do experimento.

Densitometria (mmAl) 29/05/2008 - 1. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor
OAD	1	16,6
	2	20,7
	3	19,6
	4	20,1
	5	18,3
	6	17,1
	7	18,5
	8	16,9
	9	18,4
	10	17,2
OAZ	31	20,5
	32	16,7
	33	20,5
	34	21,3
	35	19,9
	36	18,2
	37	19,7
	38	24,0
	39	19,2
	40	19,5
SAD	41	20,6
	42	17,2
	43	19,1
	44	20,7
	45	21,6
	46	20,0
	47	15,2
	48	18,1
	49	19,9
	50	20,0
SAZ	71	20,2
	72	21,7
	73	22,4
	74	20,4
	75	22,0
	76	22,9
	77	22,0
	78	22,3
	79	20,2
	80	20,1

Densitometria (mmAl) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor
OAD	11	17,4
	12	16,0
	13	16,8
	14	17,0
	15	14,7
	16	16,8
	17	16,9
	18	16,7
	19	15,2
	20	17,0
OAZ	21	21,8
	22	21,7
	23	21,5
	24	21,5
	25	20,6
	26	23,7
	27	24,3
	28	23,0
	29	23,7
	30	22,4
SAD	51	16,6
	52	18,0
	53	16,8
	54	19,0
	55	19,5
	56	18,0
	57	16,8
	58	16,6
	59	18,6
	60	18,1
SAZ	61	25,0
	62	24,4
	63	22,8
	64	23,6
	65	23,0
	66	22,5
	67	23,5
	68	22,2
	69	22,8
	70	23,3

Apêndice F – Registro da carga máxima (N) dos grupos ao longo do experimento.

Carga Máxima (N) 29/05/2008 - 1. sacrifício			Carga Máxima (N) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor	Grupo	Rato	Valor
OAD	1	134,5	OAD	11	119,1
	2	111,4		12	95,4
	3	105,8		13	111,5
	4	110,5		14	113,1
	5	133,2		15	116,8
	6	137,1		16	120,5
	7	135,4		17	124,2
	8	125,1		18	107,5
	9	115,7		19	101,7
	10	133,1		20	116,3
OAZ	31	128,8	OAZ	21	125,4
	32	133,2		22	131,7
	33	152,5		23	147,2
	34	151,7		24	149,3
	35	137,0		25	133,1
	36	137,4		26	135,8
	37	158,4		27	153,0
	38	139,0		28	140,7
	39	132,8		29	129,4
	40	143,0		30	141,2
SAD	41	126,0	SAD	51	109,0
	42	138,9		52	111,0
	43	149,4		53	125,5
	44	135,7		54	110,3
	45	141,4		55	116,8
	46	136,8		56	110,6
	47	147,1		57	124,1
	48	144,2		58	140,9
	49	138,4		59	109,7
	50	142,0		60	126,3
SAZ	71	142,5	SAZ	61	142,7
	72	152,9		62	150,4
	73	151,7		63	154,1
	74	147,1		64	148,9
	75	152,8		65	137,6
	76	154,9		66	170,7
	77	149,2		67	150,2
	78	154,2		68	140,4
	79	143,7		69	158,8
	80	148,5		70	156,7

Apêndice G – Registro do limite de elasticidade (N) dos grupos ao longo do experimento.

Limite de Elasticidade (N) 29/05/2008 - 1. sacrifício			Limite de Elasticidade (N) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor	Grupo	Rato	Valor
OAD	1	122,8	OAD	11	113,3
	2	110,5		12	90,8
	3	97,5		13	102,4
	4	97,5		14	106,3
	5	117,1		15	107,6
	6	120,3		16	118,1
	7	118,5		17	115,2
	8	123,5		18	98,6
	9	97,5		19	95,4
	10	125,0		20	110,0
OAZ	31	127,4	OAZ	21	100,5
	32	131,8		22	111,4
	33	134,2		23	124,5
	34	123,5		24	130,6
	35	125,1		25	119,2
	36	122,5		26	119,3
	37	131,8		27	134,0
	38	127,5		28	122,2
	39	130,4		29	112,6
	40	143,0		30	123,7
SAD	41	113,5	SAD	51	124,0
	42	119,4		52	111,6
	43	118,2		53	114,1
	44	119,6		54	107,3
	45	131,1		55	106,5
	46	133,3		56	103,7
	47	135,7		57	116,2
	48	129,8		58	116,6
	49	137,8		59	108,3
	50	114,6		60	118,1
SAZ	71	133,3	SAZ	61	103,9
	72	124,4		62	128,5
	73	141,0		63	111,4
	74	135,8		64	126,7
	75	149,5		65	120,0
	76	152,0		66	152,1
	77	139,8		67	110,4
	78	116,1		68	128,7
	79	137,2		69	112,2
	80	141,7		70	152,3

Apêndice H – Registro do coeficiente de rigidez (N/mm) dos grupos ao longo do experimento.

Coeficiente de Rigidez (N/mm) 29/05/2008 - 1. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor
OAD	1	207,4
	2	201,0
	3	198,8
	4	219,2
	5	257,1
	6	211,6
	7	190,7
	8	225,9
	9	203,8
	10	226,5
OAZ	31	160,2
	32	150,4
	33	157,5
	34	142,8
	35	175,0
	36	162,4
	37	166,0
	38	149,3
	39	161,1
	40	157,7
SAD	41	180,6
	42	171,7
	43	141,9
	44	176,1
	45	174,4
	46	165,0
	47	180,1
	48	154,3
	49	176,4
	50	196,5
SAZ	71	134,3
	72	109,6
	73	109,1
	74	130,9
	75	118,2
	76	133,8
	77	164,7
	78	112,7
	79	95,9
	80	191,9

Coeficiente de Rigidez (N/mm) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor
OAD	11	218,4
	12	272,4
	13	209,8
	14	235,6
	15	273,0
	16	222,5
	17	201,7
	18	236,9
	19	254,2
	20	237,5
OAZ	21	175,1
	22	178,0
	23	179,8
	24	163,2
	25	182,4
	26	169,8
	27	187,9
	28	176,4
	29	177,3
	30	174,3
SAD	51	212,1
	52	231,7
	53	225,8
	54	217,6
	55	215,9
	56	213,3
	57	221,6
	58	221,3
	59	215,7
	60	216,4
SAZ	61	144,6
	62	155,4
	63	148,5
	64	136,5
	65	147,2
	66	156,4
	67	170,4
	68	141,2
	69	158,8
	70	174,9

Apêndice I – Registro do volume ósseo (mm³) dos grupos ao longo do experimento.

Volume Ósseo (mm ³) 29/05/2008 - 1. sacrifício			Volume Ósseo (mm ³) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor	Grupo	Rato	Valor
OAD	1	0,64	OAD	11	0,40
	2	0,63		12	0,33
	3	0,62		13	0,36
	4	0,61		14	0,40
	5	0,62		15	0,34
	6	0,60		16	0,45
	7	0,65		17	0,47
	8	0,60		18	0,34
	9	0,63		19	0,49
	10	0,59		20	0,50
OAZ	31	0,83	OAZ	21	0,65
	32	0,92		22	0,63
	33	0,81		23	0,60
	34	0,84		24	0,61
	35	0,81		25	0,60
	36	0,87		26	0,62
	37	0,84		27	0,61
	38	0,93		28	0,67
	39	0,82		29	0,61
	40	0,85		30	0,62
SAD	41	0,71	SAD	51	0,46
	42	0,73		52	0,42
	43	0,69		53	0,46
	44	0,73		54	0,44
	45	0,72		55	0,47
	46	0,70		56	0,44
	47	0,74		57	0,43
	48	0,72		58	0,45
	49	0,70		59	0,45
	50	0,68		60	0,45
SAZ	71	0,95	SAZ	61	0,69
	72	1,00		62	0,66
	73	0,98		63	0,64
	74	0,95		64	0,64
	75	0,87		65	0,62
	76	0,85		66	0,60
	77	0,92		67	0,65
	78	0,82		68	0,67
	79	0,86		69	0,66
	80	0,97		70	0,60

Apêndice J – Registro do número de trabéculas (mm^{-3}) dos grupos ao longo do experimento.

Número de Trabéculas (mm^{-3}) 29/05/2008 - 1. sacrifício			Número de Trabéculas (mm^{-3}) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor	Grupo	Rato	Valor
OAD	1	3,24	OAD	11	1,98
	2	3,02		12	2,15
	3	2,20		13	1,85
	4	2,81		14	1,33
	5	3,18		15	2,02
	6	3,27		16	2,11
	7	3,47		17	1,97
	8	3,02		18	1,85
	9	2,80		19	1,65
	10	2,92		20	2,05
OAZ	31	4,79	OAZ	21	3,90
	32	4,77		22	4,55
	33	5,00		23	3,92
	34	4,31		24	3,88
	35	4,99		25	4,22
	36	4,79		26	4,10
	37	4,23		27	4,31
	38	5,02		28	4,15
	39	4,35		29	4,07
	40	4,89		30	3,80
SAD	41	4,53	SAD	51	2,84
	42	4,13		52	2,10
	43	4,13		53	2,01
	44	3,74		54	2,23
	45	3,83		55	1,79
	46	3,95		56	2,34
	47	4,57		57	2,64
	48	3,68		58	2,07
	49	4,25		59	2,30
	50	3,68		60	1,86
SAZ	71	5,98	SAZ	61	4,37
	72	6,13		62	4,63
	73	5,88		63	4,60
	74	4,77		64	4,16
	75	5,61		65	3,99
	76	5,48		66	4,20
	77	6,03		67	3,79
	78	4,70		68	4,62
	79	4,51		69	3,97
	80	6,32		70	4,92

Apêndice K – Registro do diâmetro trabecular (mm) dos grupos ao longo do experimento.

Diâmetro Trabecular (mm) 29/05/2008 - 1. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor
OAD	1	0,08
	2	0,15
	3	0,06
	4	0,07
	5	0,03
	6	0,09
	7	0,08
	8	0,10
	9	0,05
	10	0,09
OAZ	31	0,12
	32	0,16
	33	0,18
	34	0,12
	35	0,20
	36	0,20
	37	0,18
	38	0,14
	39	0,10
	40	0,13
SAD	41	0,14
	42	0,14
	43	0,12
	44	0,11
	45	0,10
	46	0,12
	47	0,15
	48	0,17
	49	0,09
	50	0,14
SAZ	71	0,11
	72	0,13
	73	0,25
	74	0,08
	75	0,29
	76	0,12
	77	0,14
	78	0,16
	79	0,19
	80	0,18

Diâmetro Trabecular (mm) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor
OAD	11	0,03
	12	0,05
	13	0,01
	14	0,03
	15	0,05
	16	0,03
	17	0,06
	18	0,02
	19	0,01
	20	0,04
OAZ	21	0,15
	22	0,12
	23	0,15
	24	0,08
	25	0,15
	26	0,12
	27	0,14
	28	0,12
	29	0,10
	30	0,12
SAD	51	0,08
	52	0,07
	53	0,07
	54	0,09
	55	0,06
	56	0,05
	57	0,07
	58	0,08
	59	0,04
	60	0,08
SAZ	61	0,08
	62	0,11
	63	0,18
	64	0,20
	65	0,22
	66	0,08
	67	0,18
	68	0,13
	69	0,16
	70	0,20

Apêndice L – Registro da distância intertrabecular (mm) dos grupos ao longo do experimento.

Distância Intertrabecular (mm) 29/05/2008 - 1. sacrifício			Distância Intertrabecular (mm) 25/08/2008 - 2. sacrifício		
Grupo	Rato	Valor	Grupo	Rato	Valor
OAD	1	0,21	OAD	11	0,26
	2	0,23		12	0,31
	3	0,28		13	0,30
	4	0,09		14	0,31
	5	0,15		15	0,33
	6	0,18		16	0,26
	7	0,29		17	0,32
	8	0,17		18	0,35
	9	0,26		19	0,33
	10	0,23		20	0,33
OAZ	31	0,13	OAZ	21	0,11
	32	0,16		22	0,16
	33	0,18		23	0,16
	34	0,13		24	0,15
	35	0,09		25	0,15
	36	0,08		26	0,17
	37	0,12		27	0,15
	38	0,15		28	0,16
	39	0,11		29	0,16
	40	0,13		30	0,17
SAD	41	0,19	SAD	51	0,29
	42	0,12		52	0,30
	43	0,18		53	0,30
	44	0,14		54	0,30
	45	0,21		55	0,30
	46	0,13		56	0,28
	47	0,16		57	0,25
	48	0,12		58	0,31
	49	0,12		59	0,28
	50	0,13		60	0,32
SAZ	71	0,13	SAZ	61	0,14
	72	0,15		62	0,14
	73	0,09		63	0,14
	74	0,13		64	0,13
	75	0,06		65	0,14
	76	0,11		66	0,13
	77	0,05		67	0,13
	78	0,11		68	0,13
	79	0,07		69	0,12
	80	0,13		70	0,15