

GISELLE SEGNINI SENRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ÓSSEA NO REPARO DE
DEFEITOS ÓSSEOS SOB A AÇÃO DO RISEDRONATO
E DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão
Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria do Espírito Santo (UNIVAP)

São José dos Campos

2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dr^ª. Andresa Costa Pereira

Prof^ª. Adjunta Rosilene Fernandes da Rocha

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^ª. Dr^ª. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Titular Victor Elias Arana-Chavez

Faculdade de Odontologia

Universidade de São Paulo – USP

São José dos Campos, 24 de julho de 2009.

Ao LINCOLN, LÍVIA e LARA

*agradeço pela presença de vocês em minha vida.
Meu sonho e minha vida são vocês!
Família que eu formei,
amo vocês demais!*

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

*Dedico mais essa realização na minha vida a vocês,
que me deram os conhecimentos e a formação primordiais para
que eu pudesse ser quem sou e lutar em mais essa batalha.
O apoio de vocês foi essencial em mais essa vitória!
Amo vocês profundamente.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

***Prof^a. Dr^a. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO e
Prof^a. Adjunta ROSILENE FERNANDES DA ROCHA,***

Agradeço a vocês me colocando na posição de amiga, de quase filha, não como orientada e aluna, porque o papel de vocês duas na minha vida nesses últimos anos ultrapassou os limites acadêmicos.

Valorizo muito essa relação conquistada e independente do curso que a minha vida venha a tomar após finalizar este trabalho, realizado com muito amor por mim, mas com a imprescindível colaboração de vocês, tenho certeza de que nosso carinho e papéis na vida uma das outras entram na categoria de perenes.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Profª. Drª. ANA MARIA DO ESPÍRITO SANTO,

Mais uma das pessoas de boa vontade que Deus colocou no meu caminho. Muito tenho a te agradecer: a orientação eficiente, a disposição, o exemplo de trabalho incessante, o estímulo e, principalmente, a alegria com que sempre me recebeu. Você acrescentou muito neste trabalho e fui muito feliz por poder contar com a sua participação.

AGRADECIMENTOS

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO RODRIGUES**, por possibilitar a realização desse doutorado.*

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

*Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Dra. **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**.*

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

*Ao Prof. Adjunto **LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA**, pela amizade e apoio.*

*Ao Prof. **IVAN BALDUCCI** pela paciência e competência na realização da análise estatística deste estudo.*

*Aos Prof. **CARLOS ALBERTO ALVES CAIRO** e **GILBERT SILVA** pelo apoio técnico e por permitirem a utilização dos seu laboratórios para a realização de análises imprescindíveis a este estudo.*

Ao Prof. Dr. **MÁRIO LIMA DE ALENCASTRO GRAÇA** pela atenção com que sempre me recebeu e pelos conhecimentos cedidos que muito me auxiliaram na compreensão de uma área de estudo tão diversa da minha.

Às funcionárias do CCI, em especial à **JANAÍNA FERREIRA AIRES DA ROCHA, JANAÍNA DA SILVA BUENO, CÍNTIA ANDRADE PIRES DE OLIVEIRA, MARIA FÁTIMA DA SILVA** e **GERALDA ROSA DE SOUZA**, anjos da guarda que cuidaram do meu pequeno tesouro Lara durante minhas horas de trabalho nesta casa, meu sincero agradecimento.

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

À bibliotecária **SILVANA ALVAREZ**, pela disponibilidade e paciência na revisão deste estudo.

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

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

A todos os **COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** pelo agradável convívio e pela colaboração direta ou indireta na realização deste estudo.

Aos amigos **PIETRO MAINENTI** e **ANGELA BOLANHO** pelo companheirismo. Nossos momentos de lazer e nossas conversas foram primordiais para superar essa fase de loucura em nossas vidas.

Às amigas **CRISTINA WERKMAN** e **ANA PAULA DE LIMA**, sempre prestativas, pelo tempo dedicado à colaboração em todas as fases da realização deste estudo, tornando-o possível de ser realizado.

SUMÁRIO

RESUMO	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	22
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	33
2.1 Osteoporose e qualidade óssea	33
2.2 Métodos de obtenção de parâmetros de qualidade óssea.....	42
2.3 Bifosfonatos X reparação e qualidade ósseas	47
3 PROPOSIÇÃO	58
3.1 Objetivos gerais	58
3.2 Objetivos específicos	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1 Animais e grupos experimentais.....	60
4.2 Método	61
4.2.1 Anestesia.....	61
4.2.2 Procedimentos cirúrgicos.....	61
4.2.2.1 Ovariectomia e falsa ovariectomia (Sham).....	61
4.2.2.2 Execução da lesão óssea.....	63
4.2.3 Tratamento	65
4.2.4 Localização dos defeitos ósseos	66
4.2.5 Sacrifício e tempos experimentais	68
4.2.6 Verificação dos efeitos da ovariectomia	68
4.2.7 Análise do reparo ósseo	69

4.2.7.1	Preparo dos fêmures para a microdureza, MEV e μ ED-XRF	70
4.2.7.2	Preparo dos fêmures para os ensaios biomecânicos	72
4.2.7.3	Análise morfológica.....	72
4.2.7.4	Mapeamento do Ca e P por micro-análise semi-quantitativa de elementos químicos.....	73
4.2.7.5	Teste de microdureza	75
4.2.7.6	Teste de flexão em três pontos	78
4.2.7.7	Análise estatística	80
5	RESULTADO	83
5.1	Variação do peso	83
5.2	Microdureza.....	86
5.3	Módulo de elasticidade	92
5.4	Concentração de cálcio.....	98
5.5	Concentração de fósforo.....	105
5.6	Relação Ca/P	112
5.7	Correlação entre microdureza e mineralização ósseas	118
5.8	Propriedades biomecânicas.....	121
5.8.1	Força máxima.....	121
5.8.2	Rigidez	127
5.8.3	Energia da força máxima	133
5.9	Análise morfológica.....	140
5.9.1	Período de 18 dias	140
5.9.2	Período de 45 dias	140
5.9.3	Período de 90 dias	141
6	DISCUSSÃO	146
7	CONCLUSÃO	158
8	REFERÊNCIAS	160
	ANEXO.....	174
	ABSTRACT.....	175

Senra GS. Avaliação da qualidade óssea no reparo de defeitos ósseos sob a ação do risedronato e da deficiência estrogênica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2009.

RESUMO

O aumento da expectativa de vida amplia as possibilidades de doenças como a osteoporose, que elevam a ocorrência de fraturas e demandam longo tratamento. Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos potenciais dos medicamentos para a osteoporose na reparação de fraturas advindas desta doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Risedronato (10,5 mg/kg/semana) na qualidade óssea do reparo ósseo em ratas com deficiência estrogênica. Para isso, 84 ratas foram submetidas à ovariectomia e 42 ratas à cirurgia *sham*. Após 35 dias, lesões de 2,5 mm foram realizadas nos fêmures quando, então, se iniciou a medicação. Os animais ovariectomizados foram divididos em dois grupos, um recebendo risedronato e o outro recebendo água filtrada como placebo. Os animais foram sacrificados com 18, 45 e noventa dias de reparo. Cortes centrais dos defeitos de metade das ratas receberam análise morfológica ao MEV, teste de microdureza Vicker's e através do μ ED-XRF foi realizado mapeamento, micro-análise semi-quantitativa do Ca e P do mineral ósseo e relação Ca/P. A outra metade dos animais, com o fêmur esquerdo operado (O) e o direito não-operado (NO), teve esses ossos congelados até a realização de ensaio de flexão em três pontos gerando valores de força máxima, rigidez e energia da força máxima. Para a análise estatística foram utilizados os testes: *t-Student*, Análise de Variância ANOVA, Comparação Múltipla de Tukey e Correlação Linear, todos com nível de significância de 5%. A microdureza (HV) se mostrou fortemente relacionada com as concentrações de Ca e de P, e moderadamente correlacionada com Ca/P. A ovariectomia não afetou os valores de microdureza e módulo de elasticidade (E), mas diminuiu a concentração de Ca, de P e a relação Ca/P aos 18 dias. O tratamento com risedronato aumentou os valores de HV e E, mas não interferiu na concentração de Ca, P e na relação Ca/P do calo ósseo. A ovariectomia e o tempo tiveram pouca influência nas propriedades biomecânicas dos fêmures O, mas o risedronato diminuiu a resistência óssea aos 18 e 45 dias. O período de noventa dias não foi suficiente para igualar os valores de HV e E dentro e fora do calo ósseo, mas a concentração de Ca e P foi igualada aos noventa dias. Os noventa dias de reparação não foram suficientes para restabelecer as propriedades biomecânicas dos fêmures O.

Palavras-chave: Difosfonatos. Regeneração óssea. Osteoporose Pós-Menopausa. Ratos. Microscopia Eletrônica de Varredura. Testes de Dureza. Espectroscopia de Emissão de Raios X.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Rata após a realização da depilação da região a ser operada para a realização da ovariectomia..... 62
- Figura 2 – Ovariectomia: a) corte da camada muscular; b) exposição dos ovários e útero; c) amarra e excisão dos ovários; d) parte do útero e tecido retirado..... 63
- Figura 3 – Defeito ósseo executado com broca esférica..... 64
- Figura 4 – Apreensão manual e gavagem para administração do medicamento..... 65
- Figura 5 – Divisão dos grupos experimentais para a realização do tratamento. 66
- Figura 6 – Radiografia digital exemplificando os parâmetros de localização do defeito ósseo..... 67
- Figura 7 – Fórmula para realização do cálculo do percentual de aumento de peso das ratas após a ovariectomia..... 68
- Figura 8 – Exemplo de útero de uma rata que sofreu cirurgia *Sham*, mostrando dimensões normais e ovários preservados e exemplo de útero mostrando atrofia, proveniente de uma rata ovariectomizada (OVX)..... 69

Figura 9 – Aparelho de micro-espectrometria de fluorescência de raios-x por energia dispersiva (μ ED-XRF) marca Shimadzu, modelo μ EDX-1300.....	74
Figura 10 – Exemplo da obtenção das médias de concentração de Ca e P nos pontos contidos na linha \overline{AB} selecionada na imagem do mapeamento desses elementos no calo ósseo.....	75
Figura 11 – Microdurômetro de Vicker's (Futuretech Digital Microhardness Tester FM).....	76
Figura 12 – Endentador de Vicker's posicionado na superfície polida da amostra.	76
Figura 13 – Fórmula para cálculo da profundidade (h) da marca da endentação. D (média do comprimento das duas diagonais da marca da endentação [μ m]); x (ângulo da pirâmide [136°])......	77
Figura 14 – Marca da endentação da pirâmide de diamante e suas diagonais \overline{AA} e $\overline{BB'}$	77
Figura 15 – Fórmula para obtenção do número de Vicker's (HV) em kg/mm^2 (Bonser, 1995). P (carga [g]); x (ângulo da pirâmide [136°]); D (média do comprimento das duas diagonais da marca da endentação [μ m]).	78
Figura 16 – Fórmula para cálculo do módulo de elasticidade (E) a partir do número de Vicker's (HV) (Coats et al., 2003).....	78
Figura 17 – Fêmur preparado e posicionado para realização do ensaio de flexão em três pontos.	80

- Figura 18 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão) dos valores de porcentagem de variação do peso obtidos em todos os tempos de sacrifício em cada um dos grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS). A) 18 dias. B) 45 dias. C) 90 dias. 85
- Figura 19 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de microdureza (HV[Kg/mm²]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = p<0,05)..... 88
- Figura 20 – Gráfico de médias dos valores de microdureza (HV[Kg/mm²]) obtidos em todos os grupos considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo..... 89
- Figura 21 – Gráfico das médias de microdureza (HV), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação..... 90
- Figura 22 – Gráfico das médias de microdureza (HV), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS aos 18, 45 e noventa dias de reparação..... 91
- Figura 23 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de módulo de elasticidade (E) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = p<0,05)..... 94

Figura 24 – Gráfico de médias dos valores de módulo de elasticidade (E) obtidos em todos os grupos, considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.	95
Figura 25 – Gráfico das médias do módulo de elasticidade (E), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	96
Figura 26 – Gráfico das médias do módulo de elasticidade (E), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	97
Figura 27 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste <i>t-Student</i> intragrupo) dos valores do percentual de cálcio (Ca) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = p<0,05).....	100
Figura 28 – Imagens do mapeamento de Ca (% peso) por μ ED-XRF de todas as condições experimentais. Linhas 1, 2 e 3 = Grupo SHAM, OVX e OVX+RIS, respectivamente. Colunas A, B e C = 18, 45 e noventa dias, respectivamente.....	101
Figura 29 – Gráfico de médias dos valores de concentração do Ca (% peso) obtidos nos grupos SHAM e OVX, considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.	102

Figura 30 – Gráfico das médias de concentração de Ca (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	103
Figura 31 – Gráfico das médias de concentração de Ca (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	104
Figura 32 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste <i>t-Student</i> intragrupo) dos valores do percentual de fósforo (P) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = p<0,05).....	107
Figura 33 – Imagens do mapeamento de P (% peso) por μ ED-XRF de todas as condições experimentais. Linhas 1, 2 e 3 = Grupo SHAM, OVX e OVX+RIS, respectivamente. Colunas A, B e C = 18, 45 e noventa dias, respectivamente.....	108
Figura 34 – Gráfico de médias dos valores de concentração do P (% peso) obtidos nos grupos SHAM e OVX, considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.	109
Figura 35 – Gráfico das médias de concentração de P (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	110

- Figura 36 – Gráfico das médias de concentração de P (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação. 111
- Figura 37 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores da relação Ca/P obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = p<0,05)..... 114
- Figura 38 – Gráfico de médias dos valores da relação Ca/P obtidos em todos os grupos considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo. 115
- Figura 39 – Gráfico das médias da relação Ca/P, dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação..... 116
- Figura 40 – Gráfico das médias da relação Ca/P, dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação..... 117
- Figura 41 – Gráficos da regressão linear entre as variáveis microdureza e concentração de Ca, P e relação Ca/P de todos os grupos. A) HV x Ca. B) HV x P. C) HV x Ca/P..... 120

Figura 42 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste <i>t-Student</i> intragrupo) dos valores de força máxima (F_u [N]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO). (* = $p < 0,05$)	123
Figura 43 – Gráfico de médias dos valores de força máxima (F_u) obtidos em todos os grupos considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO).	124
Figura 44 – Gráfico das médias da força máxima dos fêmures O dos grupos SHAM e OVX, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	125
Figura 45 – Gráfico das médias da força máxima dos fêmures O dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	126
Figura 46 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste <i>t-Student</i> intragrupo) dos valores de rigidez (S[N/mm]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO). (* = $p < 0,05$)	129
Figura 47 – Gráfico de médias dos valores de rigidez (S) de todos os grupos, considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) e não-operado (NO).....	130

Figura 48 – Gráfico das médias da rigidez dos fêmures O dos grupos SHAM e OVX, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	131
Figura 49 – Gráfico das médias da rigidez dos fêmures O dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.	132
Figura 50 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste <i>t-Student</i> intragrupo) dos valores de energia da força máxima (U[mJ]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO). (* = p<0,05).....	135
Figura 51 – Gráfico de médias dos valores de energia da força máxima (U) obtidos nos grupos SHAM e OVX, considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) e não-operado (NO).....	136
Figura 52 – Gráfico das médias da energia da força máxima dos fêmures O dos grupos SHAM e OVX, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.....	138
Figura 53 – Gráfico das médias da energia da força máxima dos fêmures O dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.....	139

- Figura 54 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE aos 18 dias.
A) Grupo OVX. Preenchimento parcial do canal medular e do defeito ósseo com com trabéculas delgadas. B) Grupo OVX+RIS. Intensa formação óssea trabecular com preenchimento completo do canal medular e defeito ósseo além de formação periostal. 142
- Figura 55 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE aos 45 dias.
A) Grupo OVX. Ponte de osso ainda jovem formada unindo as extremidades do defeito. B) Grupo OVX+RIS. Ponte óssea em remodelação unindo as extremidades do defeito e permanência do preenchimento do canal medular com osso trabecular, além de formação periostal..... 143
- Figura 56 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE aos 90 dias.
A) Grupo OVX. Ponte óssea compacta unindo as extremidades do defeito. B) Grupo OVX+RIS. Ponte óssea compacta unindo as extremidades do defeito permanência do preenchimento do canal medular com trabéculas ósseas em remodelação. 144
- Figura 57 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE. A). Osso jovem com trabéculas delgadas e numerosas lacunas. Grupo SHAM, 18 dias. B) Ponte óssea apresentando menos lacunas e mineralização heterogênea (diferentes tons de cinza).Grupo OVX, 45 dias. 145

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Distribuição dos fêmures e análises a serem realizadas.....	70
Tabela 1 – Valores de média e desvio-padrão do peso corpóreo inicial e final (g) das ratas e o percentual de variação (%) nos grupos experimentais	84
Tabela 2 – Média e desvio-padrão dos dados de microdureza (HV[Kg/mm ²]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo).....	86
Tabela 3 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo com o teste <i>t-Student</i> pareado entre as medidas de microdureza obtidas dentro e fora do calo ósseo	87
Tabela 4 – Representação das médias de microdureza (HV[Kg/mm ²]) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo	90
Tabela 5 – Representação das médias de microdureza (HV[Kg/mm ²]) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo.....	91

Tabela 6 – Média e desvio-padrão dos dados de módulo de elasticidade (E[GPa]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo).....	93
Tabela 7 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo com o teste <i>t-Student</i> pareado entre as medidas de módulo de elasticidade obtidas dentro e fora do calo ósseo.....	93
Tabela 8 – Representação das médias do módulo de elasticidade (E) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo	96
Tabela 9 – Representação das médias do módulo de elasticidade (E) dos grupos, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo.....	98
Tabela 10 – Média e desvio-padrão dos dados de concentração do Ca (% peso) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo).....	99
Tabela 11 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de concentração do Ca obtidas dentro e fora do calo ósseo com o teste <i>t-Student</i> pareado.....	99
Tabela 12 – Representação das médias da concentração do cálcio (% peso) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) da interação entre os fatores ovariectomia X tempo	103

Tabela 13 – Representação das médias do módulo da concentração do cálcio (% peso) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o fator tempo	105
Tabela 14 – Média e desvio-padrão dos dados de concentração do P (% peso) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo).....	106
Tabela 15 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de concentração do P obtidas dentro e fora do calo ósseo com o teste <i>t-Student</i> pareado.....	106
Tabela 16 – Representação das médias da concentração do P (% peso) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) da interação entre os fatores ovariectomia X tempo	110
Tabela 17 – Representação das médias do módulo da concentração do cálcio (% peso) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o fator tempo	112
Tabela 18 – Média e desvio-padrão dos dados da relação Ca/P segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo) ..	113

Tabela 19 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre os valores da relação Ca/P obtidas dentro e fora do calo ósseo com o teste <i>t-Student</i> pareado.....	113
Tabela 20 – Representação das médias da relação Ca/P dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação ovariectomia x tempo	116
Tabela 21 – Representação das médias da relação Ca/P dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o fator tempo	118
Tabela 22 – Valores de correlação ordinal de Pearson entre as variáveis de microdureza (HV) e as grandezas da mineralização óssea (percentual de Ca, de P e relação CA/P) e teste de significância (<i>p-valor</i>) para os grupos	118
Tabela 23 – Valores do coeficiente de determinação da análise de regressão entre as variáveis de microdureza (HV) e as grandezas da mineralização óssea (percentual de Ca, de P e relação Ca/P) e para os grupos.....	119
Tabela 24 – Média e desvio-padrão dos dados de força máxima ($F_u[N]$) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e fêmur analisado (O ou NO)	122
Tabela 25 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de força máxima obtidas nos fêmures O e NO com o teste <i>t-Student</i> pareado.....	122

Tabela 26 – Representação das médias de força máxima dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação ovariectomia X tempo.....	125
Tabela 27 – Representação das médias de força máxima dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação tratamento x tempo de reparo	127
Tabela 28 – Média e desvio-padrão dos dados de rigidez (S[N/mm]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e fêmur analisado (O ou NO).....	128
Tabela 29 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de rigidez obtidas nos fêmures O e NO com o teste <i>t-Student</i> pareado	128
Tabela 30 – Representação das médias de rigidez (S) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo.....	131
Tabela 31 – Representação das médias de rigidez (S) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo.....	133
Tabela 32 – Média e desvio-padrão dos dados da energia da força máxima (U[mJ]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e fêmur analisado (O ou NO)	134

Tabela 33 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de energia da força máxima obtidas nos fêmures O e NO com o teste <i>t-Student</i> pareado.....	134
Tabela 34 – Representação das médias de energia da força máxima (U [mJ]) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação ovariectomia x tempo de reparo.....	137
Tabela 35 – Representação das médias de energia da força máxima (U [mJ]) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação tratamento x tempo de reparo.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMU	=	Unidade Multicelular Básica
BV/TV	=	Volume Ósseo
Tb.Th	=	Espessura Trabecular
Tb.Sp	=	Espaçamento Trabecular
Tb.N	=	Número de Trabéculas
DMO	=	Densidade Mineral Óssea
Ca/P	=	Relação Cálcio/Fósforo
EPMA	=	<i>Electron Probe X-Ray Microanalysis</i>
WDS	=	Espectrômetro de Comprimento de Onda de Raios X
EDS	=	Espectrômetro de Energia Dispersiva de Raios X
MEV	=	Microscopia Eletrônica de Varredura
ED-XRF	=	Espectrômetro de Fluorescência de Raios X
Ca	=	Elemento Químico Cálcio
P	=	Elemento Químico Fósforo
BFs	=	Bifosfonatos
ATP	=	Adenosina Trifosfato
mg	=	Miligrama
kg	=	Quilograma
ONJ	=	Osteonecrose dos Maxilares
EV	=	Intravenosos
WHO	=	<i>World Health Organization</i>
OVX	=	Grupo de Ratas Ovariectomizadas
COBEA	=	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
PA/CEP	=	Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais
OVX+RIS	=	Ratas Ovariectomizadas e Tratadas com Risedronato
SHAM	=	Grupo de Ratas Falso Ovariectomizadas

ml	=	Mililitro
g	=	Gramma
cm	=	Centímetro
NaCl	=	Cloreto de Sódio
rpm	=	Rotações por Minuto
O	=	Fêmur Operado
NO	=	Fêmur Não-Operado
kVp	=	Quilovoltagem de Pico
CCD	=	<i>Charged-Coupled Device</i>
mm	=	Milímetro
JPEG	=	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
HV	=	Número de Dureza Vicker's
sen	=	Seno
E	=	Módulo de Elasticidade
GPa	=	Gigapascal
F _u	=	Força Máxima
N	=	Newton
S	=	Rigidez
N/mm	=	Newton por Milímetro
U	=	Energia da Força Máxima
mJ	=	Milijoule
µm	=	Micrometro
BSE	=	MEV em Modo de Elétrons Retroespalhados
LEVB	=	Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
IP&D	=	Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
UNIVAP	=	Universidade do Vale do Paraíba
Rh	=	Ródio
Si(Li)	=	Detector de Silício com camada de Lítio difundido
N ₂	=	Nitrogênio Líquido
kV	=	Quilovolt
eV	=	Elétron-volt

O	=	Elemento Químico Oxigênio
H	=	Elemento Químico Hidrogênio
gf	=	Grama-Força
Kgf	=	Quilograma-Força
n	=	Tamanho da Amostra
D	=	Dentro do Calo Ósseo
F	=	Fora do Calo Ósseo
p	=	Valor de Significância
m	=	Média
dp	=	Desvio-Padrão
r	=	Coefficiente de Correlação
r ²	=	Coefficiente de Determinação

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é um problema crescente de saúde pública no mundo devido à ocorrência de longevidade aumentada. Também a população brasileira acima dos 65 anos de idade já é a que mais cresce, aumentando a incidência de fraturas. Assim, a reparação óssea é um dos assuntos de estudo mais urgentes numa sociedade que envelhece porque uma reparação de fratura prejudicada pode aumentar dramaticamente a morbidade de pacientes idosos. Associada à ocorrência de fraturas, a osteoporose muda o curso da reparação óssea através da diminuição do volume e da velocidade de formação do calo ósseo.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos potenciais dos medicamentos usados para tratar a osteoporose na reparação de fraturas advindas desta doença. Os bifosfonatos constituem um tipo de tratamento muito utilizado para a osteoporose. Entre eles, o risedronato tem se mostrado como medicamento que não só diminui a perda óssea como também mostra sinais de maior mineralização óssea. Mas esse medicamento interfere na taxa de remodelação do calo ósseo, atrasando a substituição do osso primário, que deve ser um osso provisório, por osso lamelar, com características estruturalmente importantes para o cumprimento das funções mecânicas.

Fica o questionamento de qual é a qualidade do osso formado em defeitos ósseos sob tratamento contínuo com risedronato, trazendo a necessidade de estudos para se verificar após quanto tempo haverá a regeneração completa do osso da lesão com o restabelecimento das características histológicas e mecânicas normais do osso lamelar e

qual a influência desse processo de reparação no risco de ocorrência de novas fraturas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoporose e qualidade óssea

Uma definição internacionalmente aceita descreve a osteoporose como uma doença sistêmica e progressiva caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura desse tecido, com conseqüente aumento da fragilidade e suscetibilidade a fraturas (Genant et al., 1999). Assim, a mais importante conseqüência dessa doença é a ocorrência de fraturas, geralmente associadas com significativa morbidade e aumento de mortalidade (Ammann; Rizzoli, 2003; Watts et al., 2004). Essas fraturas ocorrem por comprometimento da resistência óssea (Ammann; Rizzoli, 2003).

A osteoporose é uma doença que tem despertado grande interesse em Saúde Pública, pois com o crescimento e envelhecimento da população mundial, o número de pessoas idosas que se encontram na faixa de risco para fraturas e mesmo a incidência idade-específica está aumentando consideravelmente (Kowalski et al., 2001). A longevidade aumentada associada ao aumento dos nascimentos ocorridos após a Segunda Guerra Mundial irá aumentar o número de americanos com risco de osteoporose nas próximas décadas (Turner R; Sibonga, 2001).

No Brasil, estima-se que a proporção de idosos (maior de 65 anos) saltará de 5,1%, em 2000, para 14,2%, em 2050. Um levantamento constatou que a proporção de mulheres acima dos 65 anos que vivem sozinhas vem aumentando. Alcançou 14,9% em 1989 e dessas, 60% possuíam renda inferior ou igual a um salário mínimo.

Dentre as pacientes maiores de setenta anos, 17,6% moravam sozinhas. Caso sofressem algum tipo de fratura, as pacientes do estudo atual enfrentariam basicamente dois problemas. Primeiro, a precariedade de recursos financeiros para seu tratamento (somente 21% tinham emprego remunerado e 43% tinham renda familiar mensal entre um e três salários mínimos) e segundo, teriam dificuldades para desempenhar as atividades da vida diária (Kowalski et al., 2001). Relatos da literatura afirmam que um ano após a fratura de quadril, 40% das pacientes estudadas ainda não estariam aptas a caminhar sem auxílio e 60% teriam dificuldades em realizar ao menos uma atividade da vida diária como se vestir, banhar-se ou preparar sua alimentação (Cooper*, 1997 citado por Kowalski et al., 2001).

Uma análise de Randell et al. (1995) calcula que os custos diretos, somente de fraturas de quadril, irão aproximadamente duplicar na maioria dos países ocidentais até o ano de 2025.

Cerca de 80% dos casos de osteoporose ocorre em mulheres pós-menopausa. Nas mulheres, a menopausa natural ou cirúrgica é seguida por um período de acelerada remodelação óssea, com taxas de formação e reabsorção aumentadas (Kimble, 1997). Deficiência de estrógeno afeta a remodelação de várias maneiras, primeiro aumenta a frequência de ativação das BMUs (Unidade Multicelular Básica), levando a uma maior remodelação e segundo, induz um desequilíbrio na remodelação. Prolonga a fase reabsortiva, reduzindo a apoptose de osteoclastos, células responsáveis por esta fase, e também encurta a fase formativa, aumentando a apoptose de osteoblastos. Como consequência destas mudanças, o volume ósseo reabsorvido nas lacunas de reabsorção fica aumentado em relação à capacidade de preenchimento destas lacunas pelos osteoblastos. A reabsorção aumenta em 90% durante a menopausa, enquanto a formação só aumenta 45% (Riggs et al., 2002).

*Cooper C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. Am J Med. 1997 Aug 18;103(2A):12S-17S; discussion 17S-19S *apud* Kowalski SC; Szejnfeld VL; Ferraz MB. Utilização de recursos e custos em osteoporose. Rev Assoc Med Bras. 2001 Out/Dez;47(4):352-7

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

A resistência óssea à fratura depende não somente da quantidade de osso, mas também da sua qualidade (Ammann; Rizzoli, 2003; Viguier-Carrin et al., 2006) e a remodelação óssea orchestra os vários fatores que contribuem para a qualidade óssea (Benhamou, 2007).

Felsenberg e Boonen (2005) descreveram a qualidade óssea como um termo amplo que descreve um conjunto de características que influenciam a resistência óssea e que explica a inter-relação dessas características. A qualidade óssea é determinada pelas propriedades estruturais e materiais do osso e é influenciada ou modificada pela taxa de remodelação. Dessa forma, condições patológicas, como a osteoporose, estão associadas com modificações na resistência óssea (Felsenberg; Boonen, 2005; Hoc et al., 2006).

As propriedades estruturais ou extrínsecas do osso incluem sua geometria (tamanho e forma), assim como sua microarquitetura (arquitetura trabecular e espessura/porosidade cortical) (Ammann; Rizzoli, 2003; Watts et al., 2004; Felsenberg; Boonen, 2005).

A microarquitetura do osso é uma importante propriedade e considera a espessura, a orientação, o espaçamento e a conectividade trabecular, assim como a espessura cortical e sua integridade. Medidas histomorfométricas são capazes de acessar a análise estrutural da microarquitetura trabecular através de exames de imagem como

ressonância magnética, microtomografia computadorizada, microrradiografia através do volume ósseo (BV/TV), da espessura trabecular (Tb.Th), do espaçamento trabecular (Tb.Sp) e do número de trabéculas (Tb.N) (Kazakia; Majundar, 2006). A deficiência dos hormônios sexuais está associada à perda óssea, com mudanças na conectividade trabecular, na redução do número de trabéculas, no aumento do espaço intertrabecular e na modificação na forma das trabéculas, de placas para barras, que são menos resistentes (Ammann; Rizzoli, 2003; Mitra et al., 2005).

Com a remodelação acelerada, lacunas de reabsorção podem ter sua profundidade aumentada levando a perfuração e perda de elementos trabeculares. Como as trabéculas são partes de uma estrutura integral, a perda de porções desta estrutura, levando a falta de conectividade de elementos estruturais, pode comprometer a resistência mecânica do osso (Kimble, 1997; Felsenberg; Boonen, 2005). A perda da conectividade trabecular é um processo irreversível (Barger-Lux; Recker, 2002) porque a perda óssea afeta primariamente a conectividade e o número trabecular, enquanto que um ganho ósseo resultará somente em espessamento trabecular, sem alterações na conectividade ou número de trabéculas. A formação de novas trabéculas não ocorre. A manutenção das trabéculas e da conectividade trabecular são os parâmetros microestruturais mais correlacionados com as propriedades mecânicas (força máxima e módulo de elasticidade) do osso trabecular (Mitra et al., 2005).

A perfuração e a perda de trabéculas individuais tem impacto maior do que a perda da mesma quantidade de osso atribuída à diminuição da espessura trabecular (Parfitt, 1984; Felsenberg; Boonen, 2005; Turner C, 2007) já que a função mecânica do osso trabecular é a distribuição da carga em articulações como a do quadril, e também tem função de resistir à compressão, como ocorre em áreas como a das vértebras (Felsenberg; Boonen, 2005). Uma perda óssea que resulte em

perfuração trabecular diminui a resistência óssea duas a cinco vezes mais que uma perda ocorrida pela diminuição da espessura trabecular (Turner C, 2007).

Exames histomorfométricos de osso transilíaco biopsiado identificaram defeitos microestruturais que, sob a luz do que se é conhecido sobre propriedades mecânicas e estruturais dos materiais, comprometerão futuramente a resistência óssea. Em mulheres durante a menopausa e com osteoporose estabelecida, um déficit tanto na espessura cortical, quanto no volume do osso trabecular tendem a ser substancialmente reduzidos. Muito do déficit de osso trabecular pode ser atribuído mais à perda de elementos trabeculares inteiros e descontinuação da conectividade trabecular do que à diminuição da espessura destes. Esses exames também encontraram que a diminuída massa óssea da osteoporose pós-menopáusicas é predominantemente um déficit de osso cortical. A perda de osso cortical envolve alargamento dos espaços medulares à custa da estrutura cortical havendo trabeculação em superfícies corticoendosteais (Parfitt, 1984; Barger-Lux; Recker, 2002).

O tamanho do osso parece ter um efeito geral sobre a fragilidade óssea (Ammann; Rizzoli, 2003; Felsenberg; Boonen, 2005) e se mostra reduzido em vértebras de mulheres com fraturas nesses ossos (Silva; Gibson, 1997). Na ocorrência das fraturas de quadril parece haver influência da prevalência de formação de ósteons com canais vasculo-nervosos gigantes e com paredes finas que aparecem como resultado de uma maior taxa de remodelação (Bell et al., 2000). A espessura cortical e o momento de inércia de ossos longos ou a área da seção transversal mínima de vértebras são fatores críticos na determinação da resistência óssea (Kazakia; Majumdar, 2006).

Com a idade, as dimensões externas dos ossos aumentam devido à aposição periosteal, acompanhada de perda óssea nas superfícies internas do mesmo (Turner C, 2007), o que poderia ser entendido como uma reação compensatória à perda da massa óssea e da

conectividade trabecular. Um aumento no diâmetro de ossos longos pode refletir em uma variação de até 55% na resistência óssea, enquanto que um aumento na espessura cortical se reflete em menor ganho de resistência (Ammann; Rizzoli, 2003), mas, segundo Silva (2007), esta expansão periosteal acontece de maneira sítio-dependente em mulheres, não protegendo o fêmur ou a tíbia contra fraturas.

Com relação às propriedades materiais, ou intrínsecas do osso, o grau de mineralização, o tamanho dos cristais de hidroxiapatita, as propriedades da matriz colágena e a relação mineral/matriz parecem ser importantes para a resistência óssea, além do tamanho e local de microlesões (Ammann; Rizzoli, 2003; Watts et al., 2004; Felsenberg; Boonen, 2005).

Em nível nanoestrutural, os cristais de apatita são responsáveis pela rigidez e resistência, enquanto que o colágeno é responsável pela ductilidade (Rubin et al., 2003; Viguet-Carrin et al., 2006), capacidade de sofrer grandes deformações antes da ruptura (Silva Junior, 1072), e também pela capacidade de absorver energia, a tenacidade do osso (Rubin et al., 2003; Viguet-Carrin et al., 2006).

Um estudo de Oxlund et al. (1996) mostrou que vértebras fraturadas de indivíduos com osteoporose mostravam redução da concentração das ligações cruzadas de colágeno resultando em redução da resistência material do osso trabecular, o que explicaria a ocorrência de fraturas mediante similar quantidade de osso trabecular quando comparados a indivíduos-controle. Viguet-Carrin et al. (2006) afirmaram que uma taxa de remodelação aumentada está associada com a quantidade de ligações cruzadas de colágeno.

O próprio envelhecimento leva o osso a ficar mais frágil, absorvendo menor energia antes de fraturar e propagando microlesões com mais facilidade, em parte por uma alteração nas ligações de colágeno (Turner C, 2007).

Rubin et al. (2003) compararam osso trabecular humano normal e osteoporótico, em nanoescala, através de microscopia de transmissão, e não encontraram diferenças significantes na geometria e organização dos cristais de hidroxiapatita entre as fibras colágenas.

Vários autores relatam a importância do grau de mineralização da matriz para a resistência óssea, independente do volume de tecido ósseo e da microarquitetura (Meunier; Boivin, 1997; Boivin et al., 2000; Boivin; Meunier, 2002a; Boivin; Meunier, 2002b; Follet et al., 2004). Hernandez et al. (2001) chegam a sugerir que uma modificação na quantidade de mineral ósseo gera uma maior redução da resistência e rigidez ósseas que uma similar diminuição do volume ósseo (BV/TV).

Follet et al. (2004) observaram um aumento da resistência óssea trabecular para uma mineralização aumentada sem a ocorrência de aumento do volume de matriz óssea e mantida a microarquitetura.

Alguns autores (Turner C, 2002; Ciarelli et al., 2003) consideram que tanto um padrão de mineralização óssea baixo, quanto alto, pode ter efeitos negativos nas propriedades materiais do osso. Pouca mineralização torna o osso mais fraco por reduzir a sua resistência e rigidez, o osso se torna fraco e pode deformar ao invés de fraturar. Elevada mineralização aumenta a rigidez estrutural do osso, mas o torna também mais frágil, pois resulta em redução de tenacidade e do trabalho até a fratura. No estado de hipermineralização se tornam rígidos e frágeis (Turner C, 2002; Fratzl et al., 2007). Um osso devidamente mineralizado deve apresentar uma combinação equilibrada de rigidez e fragilidade (Turner C, 2002).

Existe uma relação linear entre o módulo elástico e a quantidade de cálcio de um osso (Turner C, 2007).

A hipermineralização óssea tem mostrado trazer danos ao osso (Kazakia; Majundar, 2006). Akkus et al. (2004) demonstraram haver correlação entre aumento da relação mineral/matriz com a deterioração

das propriedades mecânicas estruturais e teciduais do osso compacto de ratas senis. Para os autores, o aumento da mineralização pode estar associado com reduzida ductilidade do osso por reduzir a mobilidade das fibras colágenas.

Sítios hipermineralizados que freqüentemente ocorrem em osso maduro apresentam-se como sítios de iniciação de microfraturas (Hirano et al., 2000; Kazakia; Majundar, 2006). Ocorridas as microfraturas, estas devem ser detectadas pelos osteócitos para que os mesmos ativem o mecanismo de reparação desses sítios através da remodelação óssea, evitando falha esquelética, isto é, a ocorrência de múltiplas fraturas por fragilidade óssea (Barger-Lux; Recker, 2002; O'Brien et al., 2005).

O grau de mineralização do osso depende da taxa de remodelação óssea e influencia a resistência óssea. Uma alta taxa de remodelação está associada com menor mineralização óssea (Meunier; Boivin, 1997; Viguet-Carrin et al., 2006). O processo de mineralização consiste de uma deposição primária de mineral no *front* de calcificação, seguido de um lento e progressivo aumento de deposição mineral chamado de mineralização secundária. O osso jovem é menos mineralizado que um osso maduro (Meunier; Boivin, 1997; Follet et al., 2004). A mineralização depende da atividade da remodelação, que afeta o tempo de mineralização da matriz recém-formada. Assim, uma elevada taxa de remodelação levaria à formação de um osso menos mineralizado, pois haveria uma grande probabilidade de ocorrer a reabsorção desse osso antes da sua completa mineralização ser obtida. Também uma distribuição não uniforme da mineralização de elementos trabeculares individuais teria efeitos significativos na biomecânica do osso trabecular (Ciarelli et al., 2003; Felsenberg; Boonen, 2005).

Barger-Lux e Recker (2002) consideram que a resistência óssea tem dois componentes: a densidade óssea (mensurada em gramas por unidade de área ou volume pela densitometria óssea) e a qualidade óssea. A densidade óssea na osteoporose é determinada pela quantidade

de perda óssea ocorrida em relação ao maior valor de massa óssea de um dado paciente, enquanto que para a qualidade óssea se consideram conceitos de arquitetura, mineralização, lesões ocorridas (como as microfraturas, por exemplo) e remodelamento. A densidade mineral óssea (DMO) tem sido usada como o melhor padrão de medida, pois é responsável por aproximadamente 70% da resistência óssea (Ammann; Rizzoli, 2003; Suh; Lyles, 2003), mas para Barger-Lux; Recker (2002), o acúmulo de microlesões e/ou defeitos trabeculares poderiam enfraquecer o osso mais do que poderia ser explicado pela deficiência de massa óssea. As microfraturas ocultas, por exemplo, indicam um aumento no risco de três a cinco vezes de fraturas osteoporóticas (Radominski et al., 2002). Assim, nem todas as características determinantes da resistência óssea são bem representadas pela medida da DMO, pois a densitometria não distingue se a queda de densidade resulta de perda de massa óssea e, portanto, de mineral ósseo, ou se a menor densidade reflete uma taxa de remodelação alta com a reposição de osso antigo, mais mineralizado, por um osso jovem e menos mineralizado (Felsenberg; Boonen, 2005). Como a DMO corresponde à relação entre quantidade de mineral e a área óssea, esta variável expressa não só a quantidade de mineral ósseo, mas indiretamente também reflete as dimensões do osso (Ammann; Rizzoli, 2003).

Mesmo sendo a ferramenta padrão para o diagnóstico de osteoporose, a DMO é insuficiente para medir precisamente o risco de fratura ou medir os efeitos de medicamentos antiosteoporóticos (Watts et al., 2004; Felsenberg; Boonen, 2005; Hernandez; Keaveny, 2006; Kazakia; Majumdar, 2006; Viguet-Carrin et al., 2006). Segundo Watts et al., 2004, os medicamentos para tratamento para osteoporose deveriam ser prescritos levando-se em consideração a sua eficácia na prevenção de fraturas e não nos efeitos sobre a DMO.

Uma visão mais ampla é necessária para compreender porque os ossos fraturam e como os tratamentos para osteoporose

podem ser melhorados. Assim, com esta finalidade, a qualidade óssea deve ser considerada (Watts et al., 2004; Felsenberg; Boonen, 2005).

2.2 Métodos de obtenção de parâmetros de qualidade óssea

Fraturas ocorrem quando uma força aplicada ao osso excede a capacidade desse osso de suportar esta força. Para um material homogêneo, a fratura ocorre quando a força aplicada cria uma tensão que excede a resistência do material, mas o osso é um material complexo, um compósito com numerosas propriedades mecânicas e, nenhuma delas, explica a resistência óssea adequadamente sozinha (Felsenberg; Boonen, 2005). O risco à fratura de um osso é um capítulo complexo que envolve, entre outros fatores, suas propriedades mecânicas (Kazakia; Majundar, 2006). O osso apresenta propriedades mecânicas diferentes se as forças são transmitidas a partir de diferentes direções, expressando uma propriedade óssea conhecida como anisotropia (Einhorn, 1992).

Como a fratura clínica é um evento biomecânico é aceitável dizer que qualquer modificação clinicamente relevante da qualidade óssea deve levar a uma modificação na performance biomecânica (Hernandez; Keaveny, 2006).

As propriedades biomecânicas do osso podem ser descritas em dois níveis. O primeiro considera as propriedades materiais do osso. Estas propriedades são definidas pelas qualidades teciduais do osso e são independentes da estrutura ou geometria óssea. O segundo nível leva em consideração a unidade anatômica inteira do osso, mantendo sua geometria normal (Einhorn, 1992), pois a geometria do osso afeta a distribuição da massa óssea e pode mudar a habilidade desse osso em resistir a ensaios mecânicos como flexão ou torção (Felsenberg; Boonen, 2005).

A resistência óssea pode ser avaliada por diferentes testes mecânicos que simulam, *in vitro*, as cargas mecânicas exercidas no osso (Viguet-Carrin et al., 2006). Esses ensaios podem utilizar forças de compressão, flexão, cisalhamento e tração para medir a performance biomecânica do osso, obtendo informações sobre a sua fragilidade através de propriedades como rigidez, resistência, tenacidade e outros (Hernandez; Keaveny, 2006). Para Turner C. (2002), a análise da fragilidade óssea inclui, pelo menos, três componentes: resistência, dada pela força máxima, fragilidade, obtida através da deformação máxima, e o trabalho até a fratura, obtido pela área abaixo da curva carga x deformação, todos eles podendo ser derivados de ensaios biomecânicos onde o osso recebe uma carga até a ocorrência da sua fratura.

Como o tecido ósseo é parte de uma estrutura biológica, suas propriedades mecânicas só podem ser totalmente apreciadas se houver compreensão de como essa estrutura funciona como um todo e se for considerado seu aspecto funcional. Algumas investigações devem requerer exame da estrutura óssea em vários níveis de observação, desde macro-estrutural até ultra-estrutural. Propriedades estruturais do osso como um todo dependem de propriedades da geometria e do material ósseo, podendo tornar necessários testes adicionais para determinar como modificações na composição óssea atuam nas propriedades mecânicas, principalmente se o objetivo do trabalho é investigar como a histologia do tecido ósseo influencia o comportamento mecânico do osso (Liebschner, 2004).

Na engenharia de materiais é bem conhecido que a composição de um compósito tem influência significativa nas propriedades mecânicas (Sahar et al., 2005). A fase mineral do osso é a hidroxiapatita não-estequiométrica, uma rede cristalina de fosfato de cálcio $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, e substituições no íon hidroxila podem trazer traços de magnésio ou carbonato, ou mesmo de fluoretos, que podem modificar as propriedades materiais do osso (Barger-Lux; Recker, 2002; Boivin;

Meunier, 2003). Os minerais compõem a maior parte do tecido ósseo e qualquer modificação na concentração dos seus elementos pode afetar diretamente a propriedades mecânicas do osso (Peng et al., 1997).

Medidas do conteúdo mineral do osso são geralmente aceitas como apropriadas para estimar a resistência óssea e a relação cálcio/fósforo (Ca/P) do osso tem se mostrado como um bom índice de qualidade óssea. As alterações nessa relação podem ser inclusive um indicativo de modificações na matriz orgânica do osso, principalmente no colágeno (Zaichick; Tzaphlidou, 2003; Tzaphlidou et al., 2006), e estão relacionadas com o processo de maturação mineral como uma função da relação entre mineral e matriz. No processo de maturação mineral, conforme a relação Ca/P da apatita aumenta, o mineral ósseo se torna mais cristalino e o tamanho dos cristais aumenta (Kuhn et al., 2008).

Numerosas são as técnicas de espectroscopia usadas para estudos dos elementos químicos do osso (Tzaphlidou et al., 2005). Técnicas de *electron probe X-ray microanalysis (EPMA)* são aplicadas para se determinar a concentração de elementos químicos em um volume microscópico de um espécime (Alvisi et al., 2006). Os espectrômetros de raios X podem ser de duas categorias: de comprimento de onda (WDS) e de energia dispersiva (EDS) (Maliska, 2009). Em muitos casos, as análises são realizadas através do espectrômetro de energia dispersiva de raios X (EDS) acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Howell; Boyde, 2003; Alvisi et al., 2006) ou por um feixe de raios X primários oriundos de uma fonte conhecida, como acontece em um espectrofotômetro de fluorescência de raios X.

Raios X são radiações eletromagnéticas de comprimento de onda (λ) entre 0,1 a 100 Å, produzidas pela desaceleração (*bremstrahlung*) de elétrons de alta energia e/ou por transições de elétrons nas órbitas mais internas dos átomos. Essas transições eletrônicas obedecem aos critérios de seleção de acordo com a teoria atômica quântica (Liebhafsky et al., 1966). A técnica analítica de

fluorescência de raios X por energia dispersiva (ED-XRF) é semi-quantitativa, baseando-se na medida da intensidade (número de fótons coletados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando devidamente excitada. É possível se obter medidas altamente localizadas da composição mineral óssea usando técnicas de espectroscopia de raios X. A geração desses raios X característicos ocorre pela transição de elétrons para uma um nível de menor energia dentro do átomo. A transição ocorre quando o elétron do feixe incidente interage com elétrons de camadas mais internas, geralmente na camada K e L, causando a ejeção do mesmo e deixando uma vaga nesta camada. O átomo fica então num estado excitado tendendo a voltar ao estado fundamental através de transições dos elétrons de camadas externas, de energia maior, para preencher este vazio. Quando isto ocorre, um fóton é emitido com a energia igual á diferença entre os níveis de energia. A presença de elementos químicos específicos causa uma emissão característica de raios X dentro do espectro (Haddad et al., 1998; Maliska, 2009; Coats et al., 2003). Essa emissão característica é detectada e equações físicas relacionam a concentração do elemento ao número de fótons emitidos, determinando a composição elementar da amostra e a intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra é diretamente proporcional à concentração de cada elemento presente na amostra (Coats et al., 2003; Alvisi et al., 2006).

Para Coats et al. (2003), este tipo de análise deve ser o primeiro passo na tentativa de relacionar as propriedades materiais locais com as propriedades mecânicas. Kuhn et al. (2008) acrescentam que o conhecimento da estrutura e composição do osso, e suas modificações com a idade são fundamentais para distinguir diferenças nesses parâmetros relacionadas a doenças ou medicações. Este tipo de investigação produz informações únicas sobre características estruturais e

proporciona oportunidade de conhecimentos profundos (Suvorova et al., 2007).

Outro tipo de teste que existe, o teste de microdureza, usa micro-endentação e pode medir dureza ou rigidez em regiões pequenas, em escala microestrutural, da ordem de 10-100 μm , fornecendo possibilidade de analisar pequenas amostras de osso, o que não seria possível com os testes tradicionais de flexão, torção e tração. A microdureza é uma ferramenta de valor através da qual a compreensão sobre a mecânica óssea pode ser aprimorada (Riches et al., 2000). Muitos estudos (Bonser, 1995; Broz et al., 1995; Ziv et al., 1996; Riches et al., 1997; Bateman et al., 1998; Riches et al., 2000; Phelps et al., 2000; Giavaresi et al., 2003; Ng et al., 2004) usam testes de micro-endentação para estimar a dureza da estrutura óssea.

Nessa técnica uma ponta de diamante é pressionada contra uma superfície polida do espécime com uma carga determinada durante um período de tempo, e a microdureza será determinada pelo tamanho da endentação, que está relacionada à rigidez do material, mensurada através do módulo de Young ou módulo de elasticidade (Bonser, 1995; Chachra et al., 1999; Coats et al., 2003). É um teste usado para derivar propriedades materiais como a dureza e o módulo de elasticidade de ossos e outros tecidos duros como dentina e esmalte dentários (Johnson; Rapoff, 2007). Para Bonser (1995), embora ocorra falha por cisalhamento para formar a marca da endentação, as propriedades físicas que controlam esse tipo de falha no osso são também aquelas responsáveis pela rigidez e falha por tração, isto é, a mineralização. A microdureza é largamente dependente do conteúdo mineral (Johnson; Rapoff, 2007; Chachra et al., 1999) e está predominantemente associada às propriedades plásticas da microestrutura, já que o seu valor é calculado por meio de uma impressão permanente (Riches et al., 2000).

2.3 Bifosfonatos X reparação e qualidade ósseas

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

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

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

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

Por causa da sua grande afinidade pelo mineral ósseo, os BFs atuam especificamente no osso (Boivin; Meunier, 2002a). Estudos auto-radiográficos mostram a localização preferencial de BFs marcados em superfícies de reabsorção óssea (Szejnfeld, 2000; Rodan; Reszka, 2003) apoiando a idéia de que sua presença nessa região é necessária para a ativação adequada do osteoclasto (Szejnfeld, 2000). De fato, agentes osteotrópicos tendem a se acumular em certas regiões do tecido ósseo, não se distribuindo de forma homogênea e se concentrando em locais caracterizados por alta taxa metabólica, isto é, lugares de maior remodelação óssea (Hirabayashi; Fujisaki, 2003; Stepensky et al., 2003).

Estudo de Bohic et al. (2000) questionou se os BFs, sendo ávidos pela ligação à hidroxiapatita, poderiam alterar a composição química e a estrutura cristalina do mineral ósseo já depositado, assim como a nucleação de novos cristais, particularmente por causa da longa meia-vida desses medicamentos e pelos tratamentos de longa duração requeridos.

O tratamento da osteoporose pós-menopausa com risedronato resulta em aumento da DMO e em decréscimo do número de fraturas tanto vertebrais como não-vertebrais (Lane et al., 1996; Eastell, 1998, Harris et al., 1999; Fogelman et al., 2000; Woo; Adachi, 2001).

O risedronato é um aminobifosfonato potente usado no tratamento da osteoporose pós-menopausa na dosagem de 5 diários ou 35 mg semanais, durante dois a três anos (Risedronate, 2001) e, assim com outros BFs, também vem demonstrando que o regime diário ou o intermitente de administração desses medicamentos é eficaz (Bauss; Dempster, 2007).

Para Borah et al. (2005), um dos mecanismos dos BFs que promovem a redução do risco de fratura é o aumento da mineralização do osso. Quando há elevada remodelação óssea o tempo de vida de uma BMU é curto, resultando em osso neoformado parcialmente mineralizado, comprometendo as propriedades

biomecânicas do osso. Pela redução da remodelação ocasionada pelos BFs é possível aumentar o tempo de vida da BMU e reduzir o seu número, proporcionando uma mineralização secundária com o decorrer do tempo (Boivin; Meunier, 2003; Borah et al., 2005; Roschger et al., 2008). Estes autores confirmaram essa mineralização aumentada em pacientes usando risedronato, por três anos, através de microtomografia computadorizada com radiação *synchrotron*.

Meunier e Boivin (1997) indicaram que uma variação na quantidade mineral do osso poderia explicar como pequenos aumentos de DMO estavam correlacionados com grande redução na incidência de fraturas em pacientes tomando BFs.

Estudo de Bourrin et al. (2002) encontrou aumento da DMO e da resistência mecânica de tíbias de ratas ovariectomizadas quando tratadas com o bifosfonato pamidronato sem haver alterações histomorfométricas, indicando aumento da mineralização óssea e/ou das propriedades intrínsecas da matriz óssea.

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

Fratzl et al. (2007) encontraram que o aumento da DMO vertebral em mulheres tratadas com risedronato por 3 anos se deve à combinação de um pequeno aumento no volume ósseo com uma maior concentração do mineral ósseo.

Os BFs são usados no tratamento de osteoporose desde 1977 nos Estados Unidos (Wilkinson et al., 2007), no entanto quando utilizado em associação com quimioterápicos observou-se casos de

osteonecrose dos maxilares (ONJ) (Ruggiero et al., 2004). Desde 2003, observa-se um crescente número de casos publicados, relacionando a administração de bifosfonatos intravenosos (EV), associados a casos de osteonecrose nos ossos maxilares (Wilkinson et al., 2007).

Uma revisão de 368 casos de notificações publicadas mostrou que 94% envolveram pacientes com metástase óssea ou mieloma múltiplo que recebiam bifosfonatos EV, e 60% dos casos foram precedidos por um procedimento dentário (WHO, 2006). A maioria dos casos de ONJ associada a BFs está associada também a procedimentos cirúrgicos (Brooks et al., 2007). O risco de desenvolvimento de lesões de osteonecrose após exodontias, colocação de implantes e procedimentos cirúrgicos, periodontais ou outros, em pacientes que tomam BFs orais é desconhecido (Migliorati et al., 2006).

Esses medicamentos possuem ação antiangiogênica e indutora de apoptose de células endoteliais (Brooks et al., 2007) e podem ser diretamente tumorílicas, tornando-se importantes agentes no tratamento contra o câncer. Também controlam a perda óssea resultante de lesões esqueléticas metastáticas, como aquelas associadas ao câncer de próstata, pulmão e mama e fraturas relacionadas ao mieloma múltiplo (Migliorati et al., 2006) e, mais recentemente, a indicação de tratamento com BFs se expandiu para incluir lesões osteolíticas provenientes de qualquer neoplasia sólida, resultando em rampante aumento do uso desses BFs em centros de oncologia (Wilkinson et al. 2007).

Dados fornecidos por Brooks et al. (2007) demonstram 865 casos de ONJ por bifosfonatos publicados em língua inglesa com aproximadamente 96% desses casos sendo provenientes do uso de agentes intravenosos como o pamidronato e o zoledronato, enquanto que somente 26 casos estão associados aos BFs orais, sendo que 25 deles com o alendronato e um com o risedronato. O mesmo autor relata dois novos casos atribuídos ao uso de risedronato.

Detectaram-se apenas alguns casos de ONJ em pacientes que receberam alendronato, mas é pouco claro se estes pacientes possuíam outros fatores de ordem sistêmica ou de comorbidade local (Migliorati et al., 2006).

Os 2 casos de ONJ por risedronato relatados por Brooks et al. (2007) mostram situações com inúmeros fatores associados ao uso do referido medicamento como periodontite, associação com outros medicamentos (entre eles, corticosteróides), trauma de prótese, fumo, sinusite associada, pólipos em seio nasal, utilização de enxertos, colocação de implantes na presença de fístula oroantral, etc... Diversas comorbidades trazem dúvidas sobre o verdadeiro papel desse medicamento no surgimento dessas lesões.

O mecanismo que explicaria as causas da associação entre o tratamento com BFs intravenosos e a osteonecrose dos ossos maxilares não é bem conhecido. Explicações atuais incluem uma etiologia infecciosa ou a perda de suprimento sanguíneo e a supressão da remodelação óssea (Migliorati et al., 2006; Wilkinson et al., 2007). A remodelação óssea fica comprometida quando da utilização de BFs (Migliorati et al., 2006; Senra, 2006).

Para Migliorati et al. (2006), o esforço mastigatório geraria microfraturas fisiológicas na cavidade oral que não seriam reparadas por causa da perda da capacidade de reparar microfraturas causada pelo prejuízo à remodelação óssea causado pelos BFs. Associados a este fator estariam a hipovascularização local, os traumas, uma necessidade acrescida de reparação óssea e infecção, gerando a osteonecrose.

A remodelação óssea ajuda a manter a integridade tecidual removendo seletivamente tecido danificado e o substituindo por osso novo. Turner C. (2002) afirma que como os bifosfonatos reduzem substancialmente a remodelação óssea, eles também possuem um potencial efeito adverso, prejudicar a reparação de microlesões que, acumuladas, levariam à diminuição da tenacidade do osso, efeito esse

ainda não confirmado em doses clínicas. Um aumento de 2,7 e de 4,5 vezes no acúmulo de microlesões por supressão farmacêutica da remodelação óssea, obtida com o risedronato e o alendronato, respectivamente, está associado à redução em 20% da tenacidade óssea, mesmo sem haver redução da resistência óssea (Mashiba et al., 2000; Mashiba et al., 2001).

Allen et al. (2006) encontraram aumento de 2,9 vezes no número de microlesões em vértebras de cães tratados com risedronato, com doses equivalentes à dose terapêutica, mas não encontrou correlação entre esse número e nenhuma propriedade mecânica. Nesse mesmo estudo, o risedronato foi capaz de aumentar a rigidez de vértebras de cães submetidas à compressão, mas não mostrou modificações nas propriedades materiais do osso.

A osteoporose muda o curso da reparação óssea através da diminuição da velocidade de formação do calo ósseo e da sua quantidade. Os aspectos de maior interesse de aplicação ortopédica são a fragilidade óssea, a eficácia da fixação de implantes e a reparação óssea (Egermann et al., 2005). A reparação óssea é um dos assuntos de estudo mais urgentes numa sociedade que envelhece (Maeda et al., 2004) porque uma reparação de fratura prejudicada pode aumentar dramaticamente a morbidade de pacientes idosos (Turner R et al., 2001).

Mesmo com os BFs reduzindo o risco de fraturas osteopóroticas, ainda assim ocorrerão fraturas em pacientes tratados com estes medicamentos e os eventos da reparação de fraturas são sensíveis a estes medicamentos (Koivukangas et al., 2003).

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

utilizado defeitos ósseos para avaliar a reparação óssea em ossos longos de ratas ovariectomizadas (Amadei, 2004; Silveira, 2004, Senra, 2006), com ou sem a influência de medicamentos.

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

Estudos com ratas ovariectomizadas (OVX), assim como outros em animais não castrados (Li J et al. , 1999; Li C et al., 2001), demonstraram que, na verdade, os BFs (incadronato, clodronato, pamidronato e alendronato) não impedem a iniciação da reparação de fraturas e a formação do calo ósseo, mas o uso contínuo desses medicamentos, especialmente em altas doses, impede fortemente o processo de remodelação do calo e a substituição do osso primário por osso lamelar por causa da inibição da atividade de osteoclastos, célula importante neste processo. Também verificaram uma maior mineralização no calo ósseo dos animais tratados com os BFs (CAO et al. , 2002).

Li C et al. (2001) ressaltaram em seu estudo que, durante a reparação óssea, o calo é remodelado, sendo continuamente reabsorvido e formado até a obtenção da arquitetura e da integridade mecânica normais no osso restaurado. No estudo de Senra (2006), a remodelação não chegou ao seu final em todos os grupos experimentais, no entanto, foi notado que os grupos somente ovariectomizados e *sham* remodelaram seu calos, mas formaram uma ponte delgada de osso cortical de espessura bem menor que a da cortical original. Já o grupo tratado com risedronato, mostrou atraso na remodelação óssea com permanência de calo volumoso composto por osso trabecular aos 24 dias.

A reparação óssea depende, no seu período mais longo e final, da taxa de remodelação óssea (Li C et al., 2001). Vários estudos que analisaram o uso de bifosfonatos na reparação óssea em ratos observaram atraso na substituição do osso primário por osso lamelar com o uso de diferentes bifosfonatos, inclusive do risedronato (Li J et al., 1999; Li C et al., 2001; Cao et al., 2002; Nagashima et al., 2005).

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

Odvina et al. (2005) sugerem que longos tratamentos com alendronato levaram pacientes a uma maior susceptibilidade a fraturas não-espinhais atraumáticas e a um atraso ou até mesmo ausência na reparação destas devido à intensa supressão de remodelação óssea, mesmo após a interrupção do tratamento. Os mesmos autores não sabem se esta pode ser uma resposta atípica ao tratamento com alendronato somente.

Atraso na reparação e ausência de união óssea podem ser devastadoras complicações de uma fratura, mesmo após uma longa recuperação (Amanat et al., 2005). Assim, alguns autores chegaram a sugerir (Li J et al., 1999; Cao et al., 2002) que se deveria interromper o uso de medicamentos para osteoporose em casos de fraturas não vertebrais por conta do atraso da remodelação do calo, já que o objetivo é a regeneração óssea, com formação de osso de estrutura histológica e propriedades biomecânicas iguais às originais (Li J et al., 1999). No entanto, esses mesmos autores acabaram por concluir que os bifosfonatos atrasam a remodelação do calo, mas não prejudicam a recuperação da integridade biomecânica da fratura, pois levam à formação de um calo maior que reflete uma adaptação segura da fratura para a presença de osso de qualidade estrutural e mecânica inferior ao

lamelar. Para Liebschner (2004), essas adaptações que ocorrem no osso devem ser avaliadas por testes que considerem o osso como um todo, pois o objetivo funcional dessas adaptações ósseas é restaurar as propriedades funcionais do osso como um órgão e que várias características da arquitetura óssea podem assim se mostrar insignificantes como entidades isoladas.

Amanat et al. (2005) complementam que o atraso na remodelação do calo primário na presença do medicamento pode ser benéfico por favorecer o aumento do tamanho deste calo aumentando a resistência do reparo inicial principalmente na presença de implantes intra-ósseos.

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

O risedronato se mostra capaz de estimular a formação de grande calo ósseo, com inibição de remodelação, mas o aspecto irregular do osso neoformado, com bordas de trabéculas indefinidas, aspecto de fibras desorganizadas formando estruturas enoveladas trazem preocupações a respeito da qualidade do osso neoformado (Senra, 2006). Apesar disso, estudos de histologia óssea realizados em mulheres com osteoporose tratadas com risedronato, 5mg diários, sem fraturas, indicam que o osso formado durante o tratamento é de qualidade normal (Risedronate, 2001).

O osso primário deve ser um osso provisório, pois tem disposição de fibras e mineralização irregulares, osteócitos grandes,

numerosos, de vida curta e distribuídos aleatoriamente. A composição mineral e colágena e as características estruturais da matriz óssea também interferem na resistência óssea e a organização lamelar fornece a maior densidade de colágeno por volume de tecido, sendo estruturalmente importante para o osso cumprir suas funções mecânicas (Dai et al., 2004; Liebschner, 2004). Boivin e Meunier (2002b) explicam que quanto maior a presença de proteína sólida em um tecido, menor grau de mineralização pode ser atingido e o osso lamelar apresenta o maior volume de ocupação por fibras colágenas e a menor mineralização dos tecidos normais calcificados, menor inclusive que a mineralização do osso primário.

Segundo Viguet-Carrin et al. (2006), a presença da fase orgânica nos tecidos aumenta a resistência máxima à tração das fibrilas colágenas em duas vezes e em, aproximadamente, dez vezes o módulo de Young.

O osso primário, composto por fibras colágenas grosseiras e com agrupamentos de variados tamanhos, distribuídas sem nenhum arranjo espacial e contendo mais glicosaminoglicanas sulfatadas, contrasta com a regularidade do osso lamelar (Giavaresi et al., 2003). Suas propriedades mecânicas são inferiores às do osso lamelar, mesmo com o conteúdo mineral podendo ser maior, demonstrando a importância da orientação das fibras colágenas na determinação das propriedades mecânicas do osso (Viguet-Carrin et al., 2006).

O importante papel dos osteoclastos na regulação da formação óssea osteoblástica, particularmente no desenvolvimento de matriz óssea lamelar, descrito por Dai et al. (2004) poderia ser suprimido com o uso de medicamentos inibitórios da ação osteoclástica.

Senra (2006) questiona qual é a qualidade do osso formado em defeitos ósseos e fraturas sob tratamento contínuo com risedronato, uma vez que a qualidade óssea depende de vários fatores. Há necessidade de estudos mais prolongados usando o risedronato para

se verificar após quanto tempo haverá a regeneração completa do osso da lesão com o restabelecimento das características histológicas e mecânicas normais do osso cortical e se ela ocorrerá sob tratamento contínuo ou em longo prazo com este medicamento.

Um medicamento ideal para curar a fragilidade óssea deveria melhorar a resistência óssea e reduzir a fragilidade; deveria melhorar as propriedades biomecânicas extrínsecas ou estruturais do osso, mas ao mesmo tempo não prejudicar substancialmente as propriedades intrínsecas ou materiais desse osso (Turner C, 2002).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a qualidade do osso neoformado durante a reparação de defeitos realizados em fêmures de ratas ovariectomizadas e sob o efeito do risedronato.

3.2 Objetivos específicos

- a) verificar a remodelação óssea, a concentração relativa do Ca e P no mineral ósseo, a relação Ca/P e a microdureza Vicker's;
- b) verificar potenciais correlações entre as propriedades micromecânicas locais do osso, dadas pela microdureza, e a mineralização do calo ósseo;
- c) comparar os parâmetros analisados dentro do calo ósseo com o osso preexistente fora do defeito criado;
- d) quantificar os efeitos biomecânicos das potenciais modificações na qualidade óssea do calo verificando a função estrutural do calo

ósseo e sua influência na variação da resistência à flexão entre fêmures operados e não-operados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 126 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, Wistar) com 3 e ½ meses de idade e peso aproximado de 250g, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente e alimentadas com ração Guabi Nutrilabor e água ad libitum, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob protocolo nº 030/2006-PA/CEP (Anexo A).

Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

- a) grupo OVX - ratas ovariectomizadas e tratadas com água filtrada, via oral (gavagem), semanalmente;
- b) grupo OVX+RIS - ratas ovariectomizadas e tratadas com risedronato (Actonel - Hoeschst), via oral (gavagem), 10,5mg/kg/semana, em suspensão aquosa;

- c) grupo SHAM - ratas *Sham* (falso ovariectomizadas) e tratadas com água filtrada, via oral (gavagem), semanalmente.

4.2 Método

4.2.1 Anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais receberam anestesia geral com solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Anasedan - Bayer, São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, associada a ketamina base (Dopalen - Agribrands do Brasil Ltda, Suzano, SP), anestésico geral, na proporção de 0,8:0,5ml e administrados por via intramuscular na dose de 0,1ml/100g de peso dos animais.

4.2.2 Procedimentos cirúrgicos

4.2.2.1 Ovariectomia e falsa ovariectomia (*Sham*)

Nos animais dos grupos ovariectomizados, após a anestesia geral, foi realizada depilação da região lateral do corpo, próxima à altura dos rins e logo abaixo da última costela (Figura 1) seguida de anti-sepsia com álcool iodado. Uma incisão longitudinal com extensão média de 1 cm na pele e na camada muscular foi confeccionada com o

uso de lâmina de bisturi nº20 montada em cabo de bisturi BardParker. O ovário, depois de identificado e exposto, com o auxílio de uma pinça, para fora da cavidade abdominal e, após amarra da vasculatura local, com linha de algodão, para haver contenção da hemorragia, foi excisado com parte do útero e tecidos moles adjacentes (Figura 2). As trompas foram então reposicionadas na cavidade abdominal e, em seguida, a camada muscular e a pele suturadas com fio de seda 3.0 (Ethicon - Johnson & Johnson). Nova anti-sepsia foi realizada na região com álcool iodado. Estes procedimentos foram realizados bilateralmente.

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



Figura 1 – Rata após a realização da depilação da região a ser operada para a realização da ovariectomia.

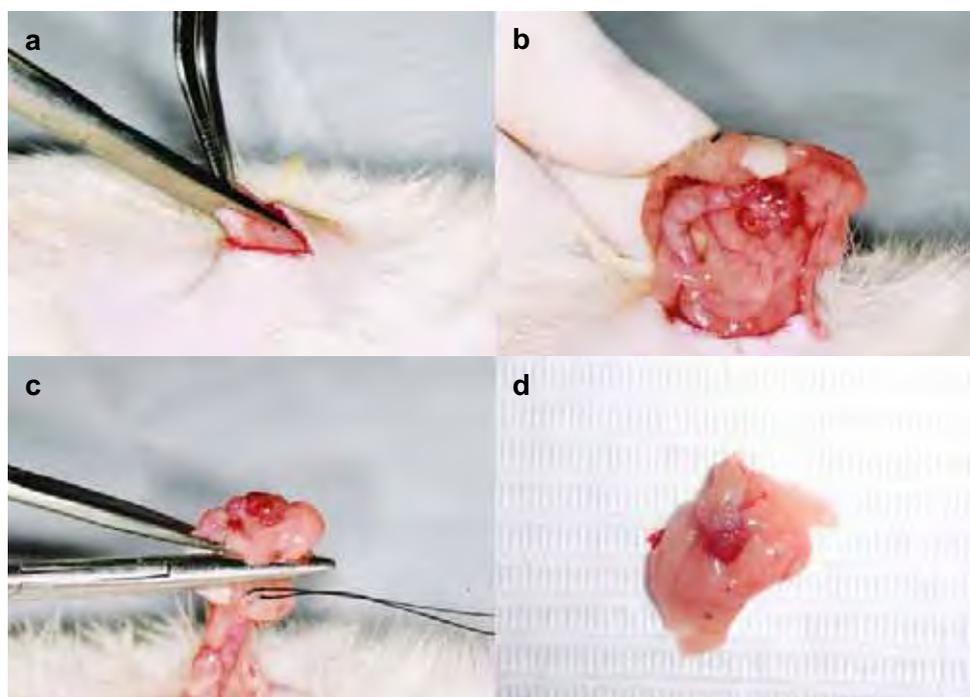


Figura 2 – Ovariectomia: a) corte da camada muscular; b) exposição dos ovários e útero; c) amarra e excisão dos ovários; d) parte do útero e tecido retirado.

4.2.2.2 Execução da lesão óssea

Em todos os animais foi realizado um defeito ósseo monocortical, arredondado, até o limite da medula óssea, nos fêmures, após 35 dias de castração. Após serem novamente anestesiados, foi realizada a depilação da região e, após anti-sepsia local com álcool iodado, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele e músculo, na região do terço distal do fêmur, face anterior, com o uso de lâmina de bisturi nº20 montada em cabo de bisturi BardParker. Após a exposição do fêmur do animal, o periósteo e os tecidos moles foram afastados com espátula nº7 até a exposição do tecido ósseo. O defeito monocortical foi realizado com a utilização de uma broca esférica carbide

de 2,5 mm de diâmetro (nº8) (Figura 3) utilizando-se motor elétrico (Asséptico – AEV 707 *Implant Surgery System*), na velocidade de 1500 rpm, sob irrigação constante e abundante com solução de NaCl 0,9% estéril durante toda a manipulação. Após preenchimento do defeito ósseo com coágulo sanguíneo e estabilização do mesmo a região foi suturada por planos com fio de seda 3.0 (Ethicon - Johnson & Johnson). Nova anti-sepsia foi realizada na região com álcool iodado.

Esse procedimento foi realizado bilateralmente em metade dos animais (fêmures utilizados para as análises de microdureza, mapeamento do Ca e P por μ ED-XRF e MEV) e unilateralmente, do lado esquerdo, na outra metade dos animais (fêmures utilizados para os ensaios de flexão). Neste último caso, os fêmures esquerdos serão chamados de “operados” (O) e, os direitos, chamados de “não-operados” (NO).



Figura 3 – Defeito ósseo executado com broca esférica.

4.2.3 Tratamento

Após a realização da lesão óssea, no mesmo dia, todos os animais receberam uma única dose de 0,15 ml/300 g da associação de antimicrobiano e antiinflamatório Agrovét Plus (Novartis Saúde Animal Ltda., São Paulo, SP) composta por benzilpenicilina (20.000.000UI), diidroestreptomicina (8,00 g), piroxicam (0,60 g) e procaína (1,73 g) e, no dia seguinte à realização da lesão, os animais iniciaram o tratamento (risedronato ou água), realizado semanalmente, via oral, por gavagem (Figura 4), com auxílio de apreensão manual, ficando então os grupos divididos conforme a Figura 5.



Figura 4 – Apreensão manual e gavagem para administração do medicamento.

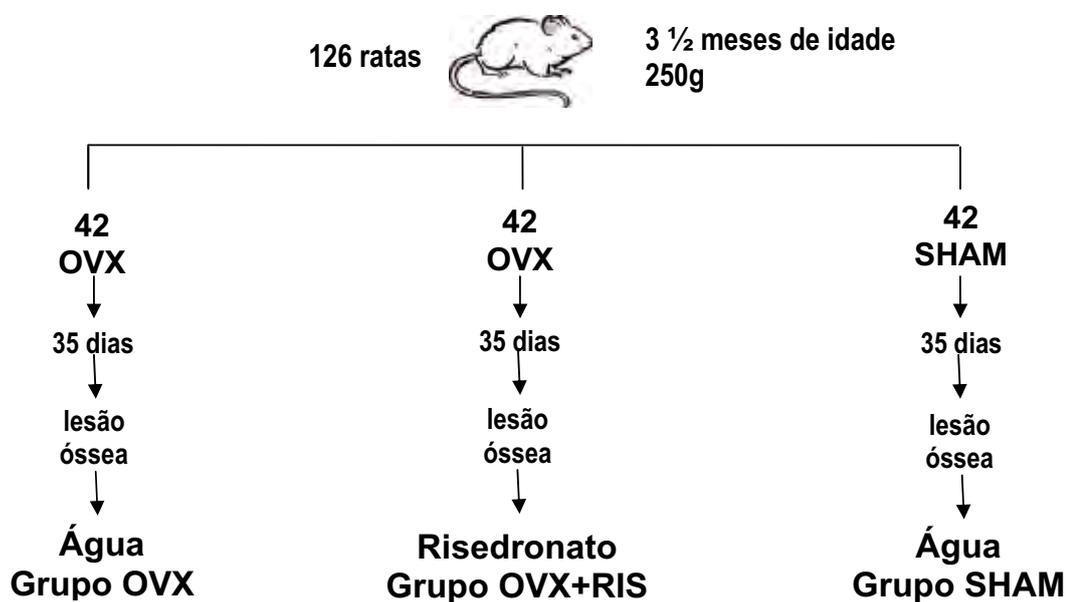


Figura 5 – Divisão dos grupos experimentais para a realização do tratamento.

4.2.4 Localização dos defeitos ósseos

Cerca de uma semana após a realização das lesões ósseas os animais foram sedados e radiografados pelo Sistema de Radiografia Digital Direta Intrabucal Visualix (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA*) dotado de dispositivo de carga acoplada e sensor CCD (charged-coupled device) para captura direta de imagem, constituído de um sistema ligado por cabo ao microcomputador, e utilizando aparelho radiográfico com corrente contínua Gendex 765DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA*) de 65kVp e 7mA com filtração de 2mm/Al, ponto focal efetivo de 0,4mm² e área focal de 6cm. Para isso os fêmures foram posicionados sobre o sensor, fixo em uma mesa, com as regiões do defeito ósseo e da articulação do joelho posicionadas sobre a área ativa do sensor, que é de

30x20 mm. As tomadas radiográficas foram realizadas com tempo de exposição de 0,025 s e com o cilindro posicionado com distância focal de 40 cm pela técnica do paralelismo. Essas imagens radiográficas (Figura 6) foram salvas em computador no formato JPEG 100 para auxiliar a localização posterior dos defeitos no fêmur e posicionamento deste para as análises que se seguirão. Para essas medidas de posicionamento foi utilizado o programa *UTHSCSA Image Tool*, versão 3.00 (*University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, Texas, USA*) utilizando o comprimento do sensor (30 mm) para calibração das medidas (Figura 6).

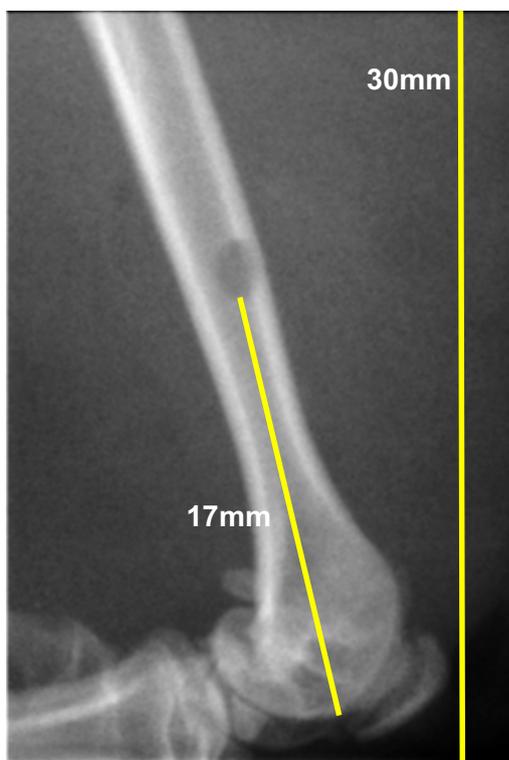


Figura 6 – Radiografia digital exemplificando os parâmetros de localização do defeito ósseo.

4.2.5 Sacrifício e tempos experimentais

Todas as ratas foram sacrificadas, em grupos sete animais, após 18, 45 e noventa dias a partir do início do tratamento. Para a realização do sacrifício foi utilizada anestesia geral em dose excessiva.

Em seguida, os fêmures foram retirados, descarnados e identificados.

4.2.6 Verificação dos efeitos da ovariectomia

Para verificação dos efeitos da ovariectomia foram observados a variação de peso dos animais, que considerou o peso inicial das ratas no dia da ovariectomia e o peso final, obtido no dia do sacrifício seguindo a fórmula apresentada na Figura 7, e também a verificação visual da atrofia uterina (Figura 8).

$$\text{Aumento de peso (\%)} = 100 \frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial})}{\text{peso inicial}}$$

Figura 7 – Fórmula para realização do cálculo do percentual de aumento de peso das ratas após a ovariectomia.



Figura 8 – Exemplo de útero de uma rata que sofreu cirurgia *Sham*, mostrando dimensões normais e ovários preservados e exemplo de útero mostrando atrofia, proveniente de uma rata ovariectomizada (OVX).

4.2.7 Análise do reparo ósseo

Para todas as condições experimentais e tempos de sacrifício, o reparo ósseo na região do defeito femural recebeu teste de microdureza Vicker's, análise do módulo de elasticidade, avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV), mapeamento do cálcio (Ca) e fósforo (P), análise da concentração relativa de Ca e P e da relação Ca/P no mineral ósseo por micro-análise quantitativa por espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (μ ED-XRF), além de ensaios biomecânicos de flexão (Quadro 1).

Quadro 1 – Distribuição dos fêmures e análises a serem realizadas

126 ratas			
63 ratas		63 ratas	
Fêmur esquerdo (O)		Fêmur direito (O)	Fêmur esquerdo (O) / Fêmur direito (NO)
Microdureza	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Número Vicker's (HV[Kg/mm²]) ▪ Módulo de elasticidade (E[GPa]) 	Reserva	Teste de flexão em três pontos <ul style="list-style-type: none"> ▪ Força máxima (F_u[N]) ▪ Rigidez (S[N/mm]) ▪ Energia da força máxima (U[mJ])
MEV	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Morfológico 		
μED-XRF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mapeamento do Ca e P ▪ Análise semi-quantitativa do Ca e P (% peso) ▪ Relação Ca/P 		

4.2.7.1 Preparo dos fêmures para a microdureza, MEV e μED-XRF

Para as análises realizadas através do teste de microdureza, da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de fluorescência de raios-X (μED-XRF), os fêmures esquerdos foram preparados segundo os passos a seguir. As peças foram totalmente descarnadas, embebidas em solução de Ringer e conservadas a uma temperatura de -20 °C, em freezer. Após, foram levadas naturalmente à temperatura ambiente e tiveram suas epífises proximais seccionadas com o uso de disco de carborundum. As peças foram desidratadas em soluções crescentes de etanol por: etanol 50% - 1

imersão de 1 hora; etanol 75% - 1 imersão de 1 hora; etanol 82%; 1 imersão de 1 hora; etanol absoluto - 1 imersão de 1 hora e 3 imersões de 24 horas e, então, submetidas à inclusão em resina de metilmetacrilato.

A inclusão em resina foi gradual, seguindo a seguinte seqüência:

- a) imersão em Solução A* (85 ml de metilmetacrilato e 15 ml de dibutiloftalato) por três a quatro dias;
- b) imersão em Solução 1* (85 ml de metilmetacrilato, 15 ml de dibutiloftalato e 1g de peróxido de benzoíla) por três a quatro dias, em geladeira;
- c) inclusão propriamente dita com imersão em Solução de Inclusão (85 ml de metilmetacrilato, 15 ml de dibutiloftalato e 3g de peróxido de benzoíla) em recipiente de vidro, com tampa, e com uma pré-base de resina já polimerizada, mantido em estufa 37 °C por 7 dias, aproximadamente.

Após a inclusão completa, os blocos foram seccionados transversalmente por meio de cortadeira (LAB CUT 1010 – EXTEC ERIOS, *International* Ltda.) com disco diamantado em local padronizado, correspondente à região central do defeito ósseo criado. A face de corte foi polida com lixa d'água de granulação 2000 em politriz Polipan-2 (PANTEC) e finalizada com pasta diamantada (grãos de 0,5 µm) em disco de flanela e, após, com sílica coloidal em disco de feltro para acabamento final. Os cortes apresentavam espessura final superior a 81 µm para valores de dureza Vicker's mínimos de 31 nas condições de análise propostas.

4.2.7.2 Preparo dos fêmures para os ensaios biomecânicos

Fêmures esquerdos, com lesão, e os direitos, sem lesão, foram submetidos a este teste para que a comparação dos resultados entre eles forneça informações sobre a influência do calo ósseo na variação da resistência à flexão dos fêmures e também sobre os valores obtidos na quantificação das propriedades biomecânicas extrínsecas do fêmur. Para isso, as peças foram totalmente descarnadas, embebidas em solução de Ringer e conservadas a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em freezer, até o dia da realização do teste de flexão, quando então foram levadas naturalmente à temperatura ambiente.

4.2.7.3 Análise morfológica

Os aspectos morfológicos da reparação óssea foram analisados levando em consideração o desenvolvimento, a maturação e remodelação das trabéculas ósseas mineralizadas, formação de ponte óssea cortical no reparo ósseo, além da fusão do osso neorformado com o osso cortical adjacente ao defeito ósseo e liberação do canal medular.

Para isso foi utilizada a observação de imagens obtidas através do microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO[®] MA10 (*Series SEM – Carl Zeiss SMT Ltd / Cambridge – England*) em modo de elétrons retroespalhados (BSE), realizadas no IP&D/UNIVAP.

4.2.7.4 Mapeamento do Ca e P por micro-análise semi-quantitativa de elementos químicos

A análise μ ED-XRF permite fazer uma análise espectral do mineral ósseo e obter dados qualitativos e quantitativos a respeito dos elementos químicos presentes em pontos escolhidos na amostra analisada, dentro e fora do defeito. Foram verificadas as proporções relativas (concentração em peso) dos elementos químicos do mineral ósseo, cálcio (Ca) e fósforo (P), e a relação Ca/P na superfície das amostras durante os tempos de reparo estudados.

Essas análises foram realizadas no LEVB/IP&D/UNIVAP, em um espectrofotômetro de Fluorescência de Raios-X (Shimadzu μ EDX-1300 – *Kyoto - Japan*) (Figura 9), equipado com tubo de raios X de ródio (Rh) e um detector de Si(Li) resfriado por nitrogênio líquido (N₂) conectado a uma computador para realização do processamento dos dados. A voltagem utilizada no tubo foi de 15 kV, com ajuste automático da corrente e feixe com diâmetro de 50 μ m. As amostras colocadas na câmara do aparelho tiveram suas superfícies irradiadas com raios X, sendo realizada uma varredura longitudinal superficial de cada área selecionada com tempo de leitura de 10 s por ponto (tempo real), somando um total de 260 minutos para leitura de 1200 pontos, numa janela com medidas de 2,0 x 1,5 mm, com passos de 50 μ m, somando 1200 pontos medidos (40x30). A energia da varredura irá variar entre 0.0 e 40.0 eV. O equipamento foi calibrado utilizando-se, como referência, reagente comercial certificado de hidroxiapatita estequiométrica com grau de pureza mínimo 99.999% (*Sigma-Aldrich, synthetic Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, grade 99.999%, lot 10818HA*). As medidas foram coletadas sob parâmetros fundamentais de emissão de raios-X característicos dos elementos Ca e P, e os elementos O e H serão utilizados para balanço químico. A energia de calibração utilizou padrões internos do equipamento.

Após isso, dentro da área de mapeamento, foram obtidas as médias da concentração do Ca e do P de um total de dez pontos contidos numa linha de 0,5 mm de comprimento selecionada no osso preexistente e dentro do calo ósseo (Figura 10). Essas médias foram utilizadas para a realização do cálculo da relação Ca/P média dessas regiões analisadas.



Figura 9 – Aparelho de micro-espectrometria de fluorescência de raios-x por energia dispersiva (μ ED-XRF) marca Shimadzu, modelo μ EDX-1300.

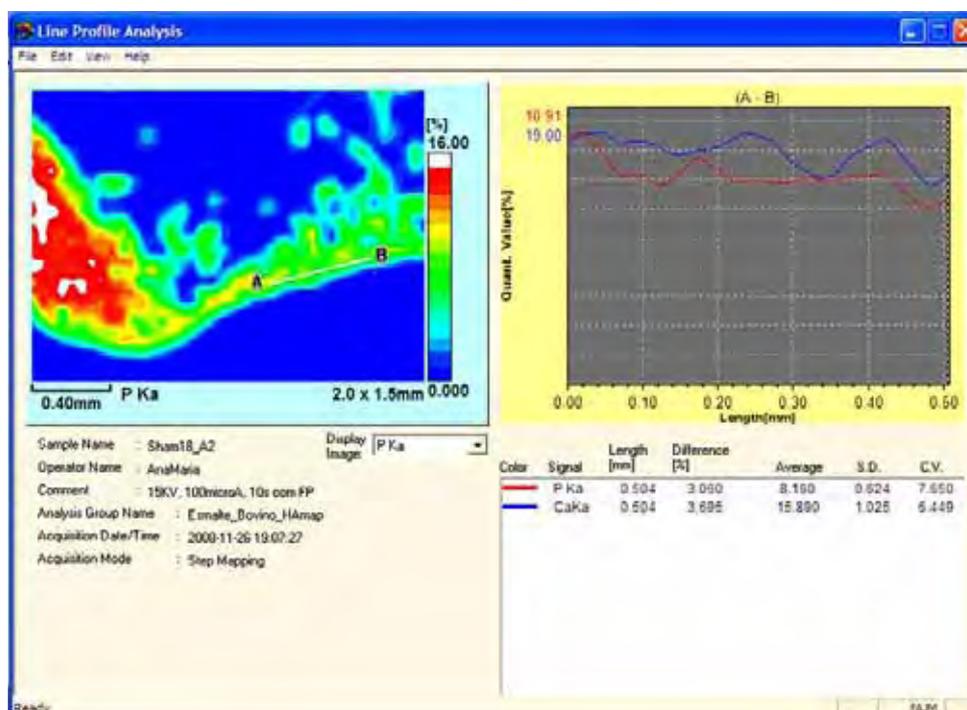


Figura 10 – Exemplo da obtenção das médias de concentração de Ca e P nos pontos contidos na linha \overline{AB} selecionada na imagem do mapeamento desses elementos no calo ósseo.

4.2.7.5 Teste de microdureza

A microdureza e o módulo de elasticidade do osso das amostras foram determinados através da utilização do Microdurômetro de Vicker's (Futuretech Digital Microhardness Tester FM) (Figura 11) com endentação de diamante com formato piramidal (136°), com carga de 25 gf, durante 10 segundos, segundo Dall'Ara et al. (Figura 12).



Figura 11 – Microdurômetro de Vicker's (Futuretech Digital Microhardness Tester FM).



Figura 12 – Endentador de Vicker's posicionado na superfície polida da amostra.

Foram obtidas marca da endentação na superfície polida do espécime, de espessura mínima superior a 10x à profundidade (h) da endentação, calculada segundo a fórmula apresentada na Figura 13.

$$h = \frac{D/2}{\tan(x/2)} = \frac{D/2}{\tan 68^\circ} = \frac{D/2}{2,475} = \frac{D}{4,95}$$

Figura 13 – Fórmula para cálculo da profundidade (h) da marca da endentação. D (média do comprimento das duas diagonais da marca da endentação [μm]); x (ângulo da pirâmide [136°]).

O comprimento das diagonais das marcas foi medido (Figura 14), sob aumento de 400x, para a realização do cálculo do número de dureza Vicker's (HV) através da tabela de Vicker's que considera a equação apresentada na Figura 15.

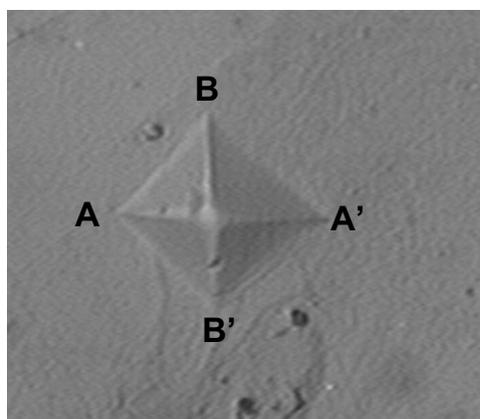


Figura 14 – Marca da endentação da pirâmide de diamante e suas diagonais $\overline{AA'}$ e $\overline{BB'}$.

$$HV = \frac{2P \operatorname{sen}(x/2)}{D^2} 10^3 = \frac{2P \operatorname{sen} 68^\circ}{D^2} 10^3 = \frac{1854P}{D^2}$$

Figura 15 – Fórmula para obtenção do número de Vicker's (HV) em kg/mm² (Bonser, 1995). *P* (carga [g]); *x* (ângulo da pirâmide [136°]); *D* (média do comprimento das duas diagonais da marca da endentação [μm]).

Foram endentados quatro pontos da região central do calo ósseo e quatro pontos no osso cortical preexistente, adjacente ao defeito ósseo. Os valores de microdureza foram determinados pela média dos quatro valores medidos por região considerada. Uma separação de pelo menos uma vez a medida das diagonais foi mantida entre as endentações a fim de se evitar efeitos indesejados decorrentes da proximidade com bordas de medidas anteriores.

Para a obtenção do módulo de elasticidade do osso (E[GPa]) a partir do número de dureza de Vicker's foi considerada a seguinte fórmula apresentada na Figura 16, segundo Coats et al. (2003).

$$E = 0,561(HV)^{0,747}$$

Figura 16 – Fórmula para cálculo do módulo de elasticidade (E) a partir do número de Vicker's (HV) (Coats et al., 2003).

4.2.7.6 Teste de flexão em três pontos

As propriedades biomecânicas dos fêmures foram determinadas por meio do teste de resistência à flexão com três apoios utilizando a máquina universal de ensaios EMIC DL 2000 (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, PR) programada para realizar uma carga com velocidade constante de aplicação de 5.00 mm/minuto e célula de carga com capacidade de medir

100 Kgf até a obtenção da fratura total do fêmur.

Cada espécime foi colocado com a face anterior, contendo o defeito monocortical, centralizada e tocando os dois suportes inferiores, distantes 15 mm um do outro. A carga foi aplicada em um único ponto, orientada transversalmente ao longo eixo do fêmur, sobre sua face posterior (oposta ao defeito), em um ponto médio entre os dois apoios, ponto este que estava alinhado com a posição do defeito (Figura 17). Dessa forma a falha ocorreu na região do defeito criado, local que recebeu uma tensão de tração. A localização da posição do defeito foi realizada com o auxílio da radiografia digital previamente realizada.

Por meio do programa TESC standard, versão 1.10, as seguintes propriedades extrínsecas do osso foram obtidas e avaliadas:

- a) força máxima (F_u [N]): valor máximo da carga durante o teste;
- b) rigidez (S [N/mm]): ângulo da curva cargaXdeslocamento na região linear;
- c) energia da força máxima (U [mJ]): energia total absorvida pelo espécime até a aplicação da força máxima, sendo calculada como a área sob a curva cargaXdeslocamento.

A largura médio-lateral da região do defeito foi utilizada para se verificar a existência de variações anatômicas entre as peças operadas e não-operadas por ser essa medida a mais precisa de ser realizada com paquímetro digital.

Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente.



Figura 17 – Fêmur preparado e posicionado para realização do ensaio de flexão em três pontos.

4.2.7.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada em duas partes. A primeira seguindo um esquema fatorial tipo 2x3, sendo que as variáveis independentes consideradas foram a presença (*Sham*) ou ausência de ovários (OVX) e os tempos de sacrifício dos animais (18, 45 e noventa dias). A segunda parte da análise estatística seguiu um esquema fatorial tipo 2x3, sendo que as variáveis independentes consideradas serão os tipos de tratamento - OVX + água (OVX) e OVX + risedronato (OVX+RIS), e os tempos de sacrifício dos animais (18, 45 e noventa dias). Nas duas partes da estatística teremos uma variável dependente representada pela localização da análise realizada (dentro e fora do calo ósseo ou fêmur

operado e não-operado).

Os parâmetros de qualidade óssea serão medidos operacionalmente das seguintes formas:

- a) microdureza ($HV[Kg/mm^2]$) (dentro e fora do calo ósseo);
- b) módulo de elasticidade ($E[GPa]$) (dentro e fora do calo ósseo);
- c) $\mu ED-XRF$ (dentro e fora do calo ósseo);
 - análise semi-quantitativa dos elementos químicos Ca e P (% peso);
 - relação Ca/P;
- d) ensaio de flexão (fêmures O e NO);
 - força máxima ($F_u [N]$);
 - rigidez ($S[N/mm]$);
 - energia da força máxima ($U[mJ]$).

Os dados obtidos foram analisados de forma descritiva (média e desvio-padrão) e inferencial. A análise da porcentagem de variação de peso dos animais foi analisada somente de forma descritiva.

Para a comparação intragrupo entre as medidas obtidas dentro e fora do calo ósseo ou no fêmur operado e não-operado o teste *t-Student* pareado foi empregado para verificar se os parâmetros de qualidade óssea obtidos no calo ósseo atingiram os valores obtidos no osso cortical preexistente e para verificar se as propriedades biomecânicas do fêmur operado eram semelhantes àsquelas do fêmur contralateral não-operado.

Para os dados obtidos dentro do calo ósseo no teste de microdureza e na análise pelo $\mu ED-XRF$ e para os obtidos nos fêmures operados do ensaio de flexão foram utilizados a Análise de Variância ANOVA (fator duplo) e o teste de Comparação Múltipla de Tukey. O teste

de Correlação Linear de Pearson foi utilizado para comparar os dados da microdureza com os da concentração de Ca, P e da relação Ca/P. Todos os testes usaram nível de significância de 5%.

As suposições do modelo de análise de variância foram avaliadas, antes da aplicação do teste ANOVA e os resíduos decorrentes do ajuste do modelo adotado foram examinados para avaliar a adequabilidade do modelo para válidas inferências estatísticas. Foi determinado que os dados originais propiciaram um adequado ajuste porque os valores residuais se ajustam a uma distribuição normal de probabilidade. Ainda foi verificada a uniformidade dos resíduos (homocedasticidade) por meio dos gráficos dos valores resíduo em relação aos valores ajustados.

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas STATISTIX *for Windows* (2003 - *Analytical Software, version 8.0*), MINITAB (2004 - Minitab, *version 14.12*) e STATISTICA (2007 - *StatSoft, version 8.0*).

5 RESULTADO

Neste capítulo foram analisados os dados que forneceram meios de análise da qualidade óssea.

Para as análises quantitativas, os dados obtidos foram divididos e analisados em três partes. Na primeira, foi realizada a estatística descritiva de todas as condições experimentais. Na segunda parte, foram analisados e comparados os grupos OVX e SHAM, que receberam água, enquanto que na terceira parte, foram comparados os dados dos animais dos grupos ovariectomizados entre si (OVX e OVX+RIS).

5.1 Variação do peso

Os valores médios dos pesos das ratas obtidos foram apresentados na Tabela 1 e o percentual de ganho de peso foi representado na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas (Figura 18).

Todos os grupos apresentaram valores médios de peso final maiores que os valores iniciais. Observou-se em todos os grupos experimentais que o fator tempo determinou gradual ganho de peso, tanto na presença quanto na ausência do hormônio estrógeno (Figura 18), mas esse ganho de peso foi maior nas ratas do grupo OVX, seguido do grupo OVX+RIS, apresentando o grupo SHAM o menor percentual de variação

de peso, em todos os períodos de sacrifício.

Tabela 1 – Valores de média e desvio-padrão do peso corpóreo inicial e final (g) das ratas e o percentual de variação (%) nos grupos experimentais

Grupo	Peso	Tempo (dias)	n	Média	Desvio-padrão
SHAM	Inicial (g)	18	13	273,85	25,91
		45	13	266,31	34,53
		90	16	277,69	25,14
	Final (g)	18	13	295,00	19,04
		45	13	306,15	27,25
		90	16	334,06	37,78
	Variação (%)	18	13	8,10	5,96
		45	13	15,75	8,93
		90	16	20,65	12,60
OVX	Inicial (g)	18	19	276,05	18,07
		45	19	278,16	20,70
		90	18	288,33	18,94
	Final (g)	18	19	321,58	29,11
		45	19	350,00	31,93
		90	18	381,11	34,41
	Variação (%)	18	19	16,62	8,79
		45	19	26,09	10,06
		90	18	32,21	8,45
OVX+RIS	Inicial (g)	18	13	253,08	21,36
		45	10	265,50	17,39
		90	18	270,00	16,09
	Final (g)	18	13	290,77	28,49
		45	10	326,50	32,90
		90	18	348,10	43,80
	Variação (%)	18	13	15,14	9,14
		45	10	23,01	9,63
		90	18	28,66	11,93

n = tamanho da amostra

g = gramas

SHAM = Sham + água

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

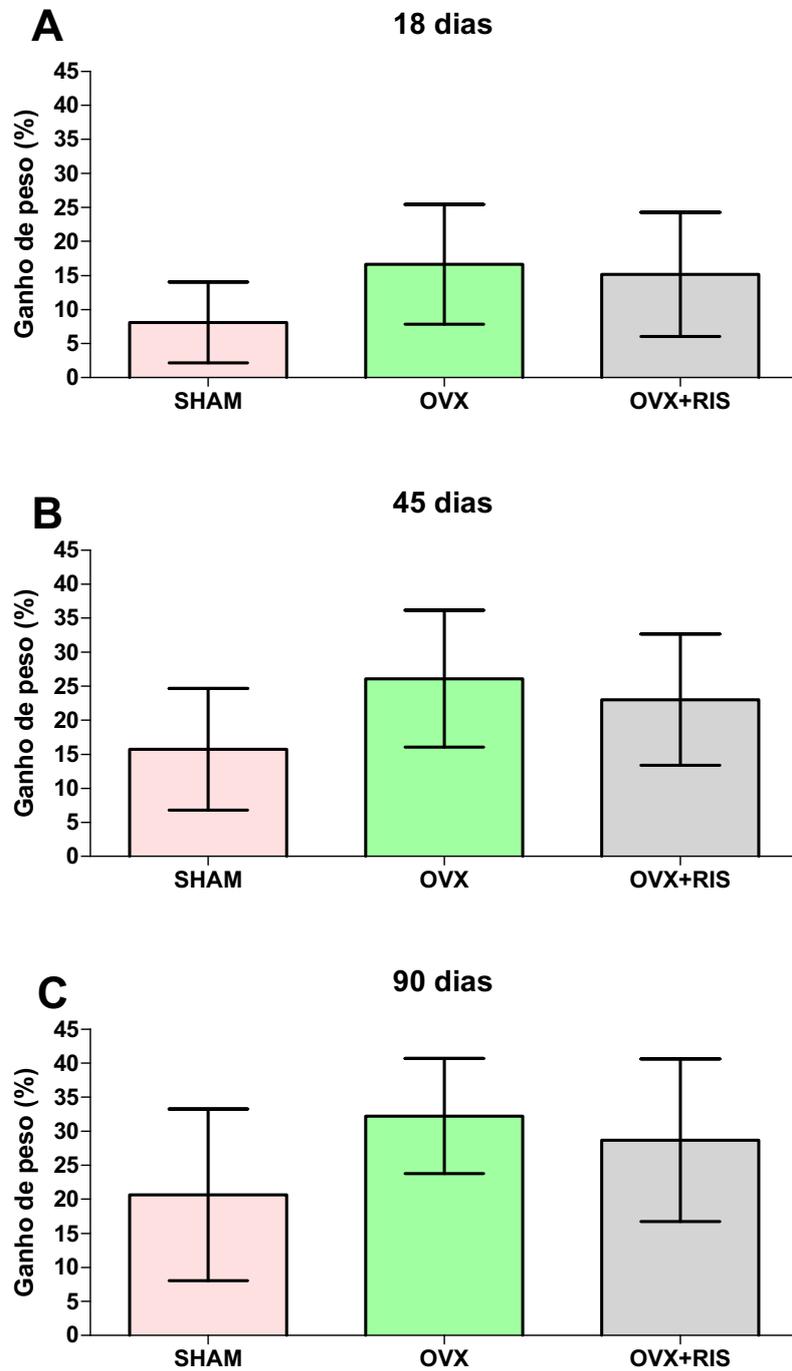


Figura 18 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão) dos valores de porcentagem de variação do peso obtidos em todos os tempos de sacrifício em cada um dos grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS). A) 18 dias. B) 45 dias. C) 90 dias.

5.2 Microdureza

A estatística descritiva dos dados de microdureza foi apresentada na Tabela 2 e representada na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas (Figura 19).

Tabela 2 – Média e desvio-padrão dos dados de microdureza (HV[Kg/mm²]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo)

Tempo de Reparo	n	HV (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		Dentro	Fora	Dentro	Fora	Dentro	Fora
18	7	36,46 ±4,11	69,52 ±7,69	34,30 ±3,72	72,18 ±6,22	35,19 ±4,07	68,49 ±5,13
45	7	56,88 ±5,07	75,74 ±6,19	51,71 ±2,73	73,49 ±3,68	53,05 ±3,04	73,98 ±3,68
90	7	66,11 ±7,85	87,22 ±6,85	65,14 ±6,35	77,71 ±5,01	71,73 ±3,61	88,18 ±9,65

m±dp(p) = média ± desvio-padrão(p-valor)

n = tamanho da amostra

SHAM = Sham + água

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

As médias de todos os grupos, tanto dentro como fora do calo ósseo, mostraram valores crescentes com o aumento do tempo de reparo de 18 até noventa dias.

Os valores médios de microdureza dentro do calo ósseo foram sempre menores que aqueles obtidos fora do mesmo, no osso preexistente, para todos os grupos e em todos os tempos de reparo e apresentaram diferenças significantes quando aplicado o teste *t-Student*

pareado intragrupo ($p < 0,05$) (Tabela 3) em todas as condições experimentais.

Tabela 3 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo com o teste *t-Student* pareado entre as medidas de microdureza obtidas dentro e fora do calo ósseo

Grupo	p
SHAM 18 dias	0,000*
SHAM 45 dias	0,001*
SHAM 90 dias	0,003*
OVX 18 dias	0,000*
OVX 45 dias	0,000*
OVX 90 dias	0,009*
OVX+RIS 18 dias	0,000*
OVX+RIS 45 dias	0,000*
OVX+RIS 90 dias	0,003*

* $p < 0,05$

A discrepância entre os valores obtidos dentro e fora do calo ósseo diminui com o aumento do tempo de reparo (Figura 20), principalmente dos 18 aos 45 dias e de forma mais acentuada no grupo OVX.

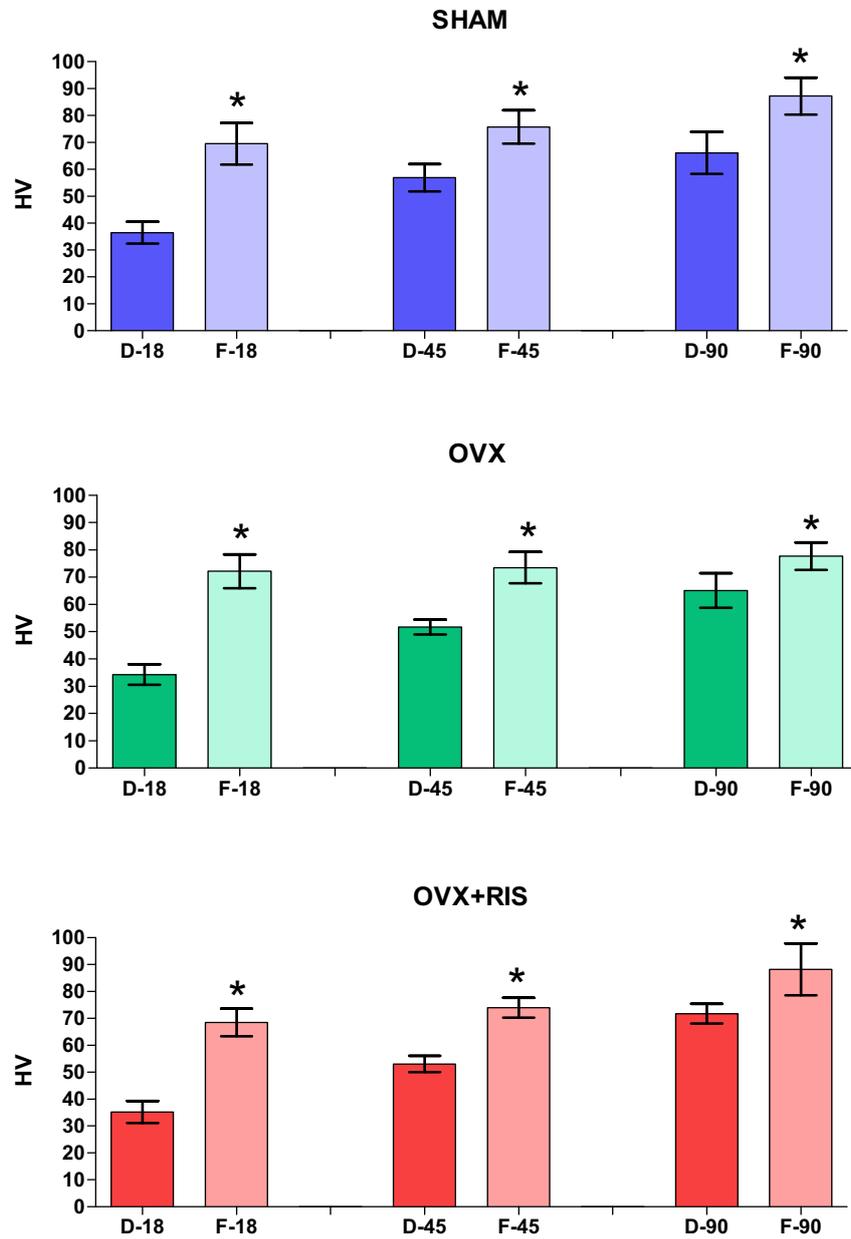


Figura 19 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de microdureza (HV[Kg/mm²]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = p<0,05)

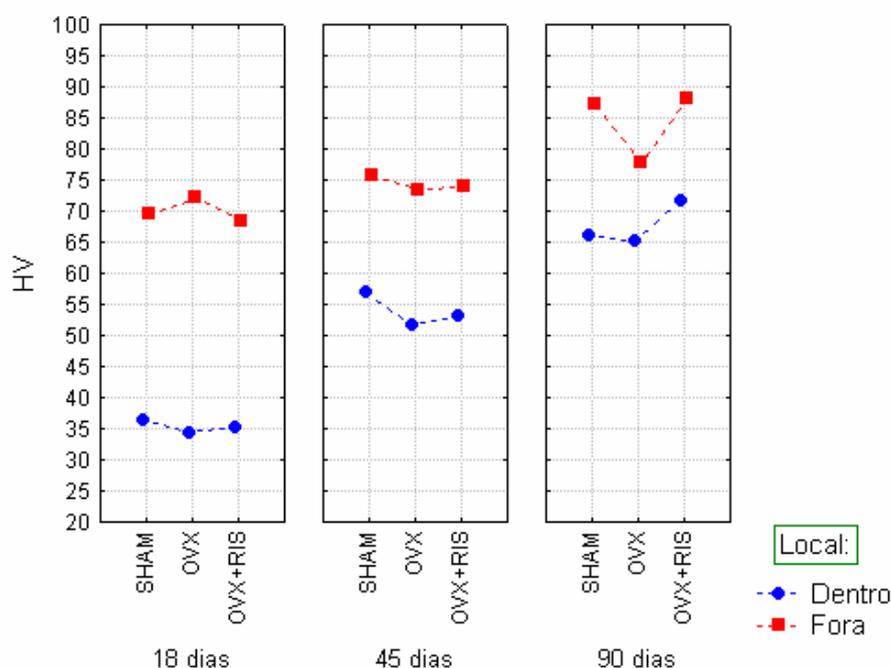


Figura 20 – Gráfico de médias dos valores de microdureza (HV[Kg/mm²]) obtidos em todos os grupos considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo na reparação do defeito ósseo, foi realizada a análise de variância ANOVA, considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,5578$). Não houve significância também do fator ovariectomia ($p=0,0966$) individualmente, rejeitando a hipótese de desigualdade entre os grupos SHAM e OVX (Figura 21). Houve significância somente para o fator principal tempo ($p=0,0000$).

A realização do teste de Tukey para o fator tempo permitiu separar este fator em três grupos homogêneos com os maiores valores encontrados aos noventa dias e, os menores, aos 18 dias (Tabela 4).

Tabela 4 – Representação das médias de microdureza (HV[Kg/mm²]) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média HV	Grupos Homogêneos
90	65,627	A
45	54,291	B
18	35,379	C

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

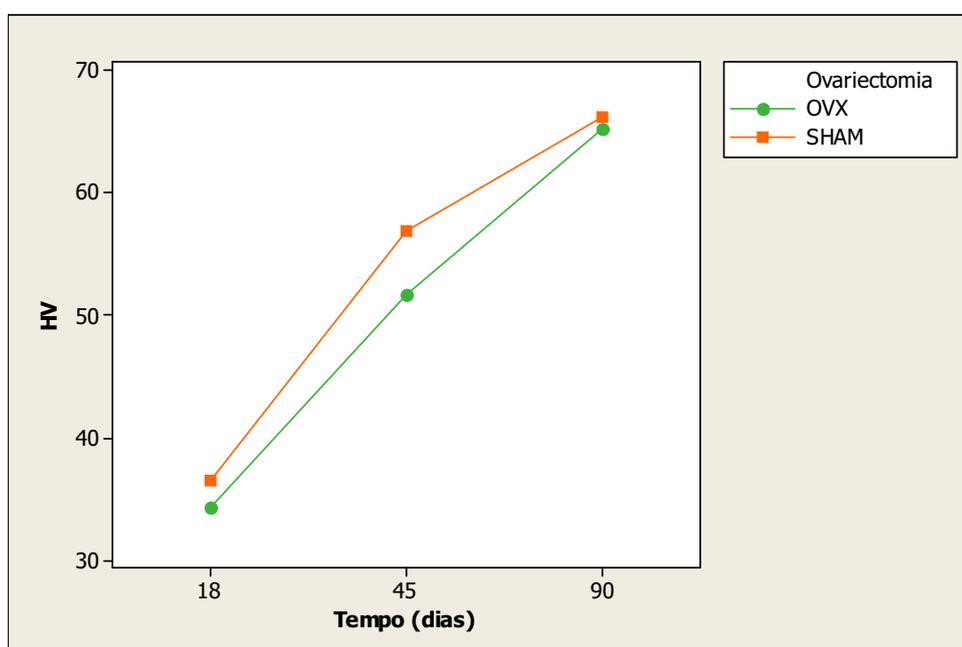


Figura 21 – Gráfico das médias de microdureza (HV), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS (Figura 22), somente com os valores obtidos dentro do calo ósseo, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo, na reparação óssea, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores tratamento x tempo ($p=0,1380$), sendo significantes os fatores

principais tempo ($p=0,0000$) e tratamento ($p=0,0254$), demonstrando diferenças entre os grupos OVX (média 50.382) e OVX+RIS (média 53.325).

Após o teste de comparação múltipla de Tukey para o fator tempo verificou-se a formação de três grupos homogêneos, com os maiores valores encontrados aos noventa dias e os menores aos 18 dias (Tabela 5).

Tabela 5 – Representação das médias de microdureza (HV[Kg/mm²]) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média HV	Grupos Homogêneos
90	68,436	A
45	52,380	B
18	34,745	C

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

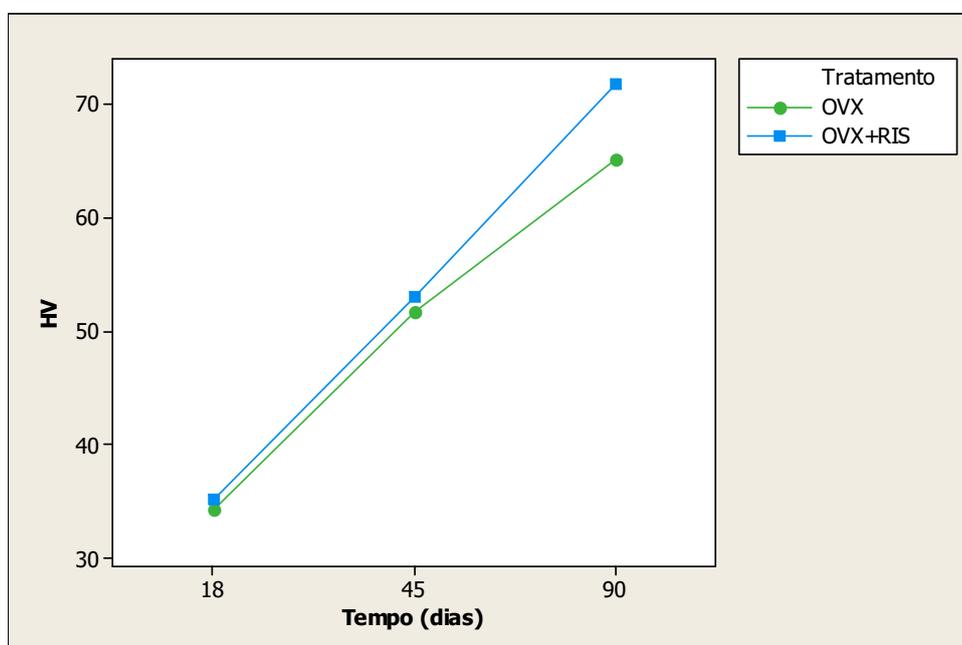


Figura 22 – Gráfico das médias de microdureza (HV), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

5.3 Módulo de elasticidade

Os dados referentes à estatística descritiva são apresentados na Tabela 6 e representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas (Figura 23).

As médias de todos os grupos, tanto dentro como fora do defeito ósseo, aumentaram com o aumento do tempo de reparo. O fator tempo interferiu mais nos valores encontrados dentro do calo ósseo que no osso preexistente, fora do calo ósseo (Figura 24).

Observou-se que as médias dentro do calo ósseo foram sempre menores que aquelas obtidas fora do mesmo em todos os grupos e tempos de reparo e com diferenças estatisticamente significantes (Tabela 7) quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p < 0,05$) em todas as condições. Essas discrepâncias foram maiores aos 18 dias de reparação.

Tabela 6 – Média e desvio-padrão dos dados de módulo de elasticidade (E[GPa]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo)

Tempo de Reparo	n	E (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		Dentro	Fora	Dentro	Fora	Dentro	Fora
18	7	8,226 ±0,688	13,323 ±1,106	7,859 ±0,633	13,707 ±0,889	8,011 ±0,689	13,181 ±0,738
45	7	11,471 ±0,771	14,210 ±0,869	10,688 ±0,421	13,894 ±0,800	10,895 ±0,468	13,966 ±0,515
90	7	12,830 ±1,137	15,790 ±0,931	12,694 ±0,926	14,448 ±0,698	13,648 ±0,514	15,912 ±1,305

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = Sham + água;

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

Tabela 7 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo com o teste *t-Student* pareado entre as medidas de módulo de elasticidade obtidas dentro e fora do calo ósseo

Grupo	p
SHAM 18 dias	0,000*
SHAM 45 dias	0,001*
SHAM 90 dias	0,003*
OVX 18 dias	0,000*
OVX 45 dias	0,000*
OVX 90 dias	0,009*
OVX+RIS 18 dias	0,000*
OVX+RIS 45 dias	0,000*
OVX+RIS 90 dias	0,003*

*p<0,05

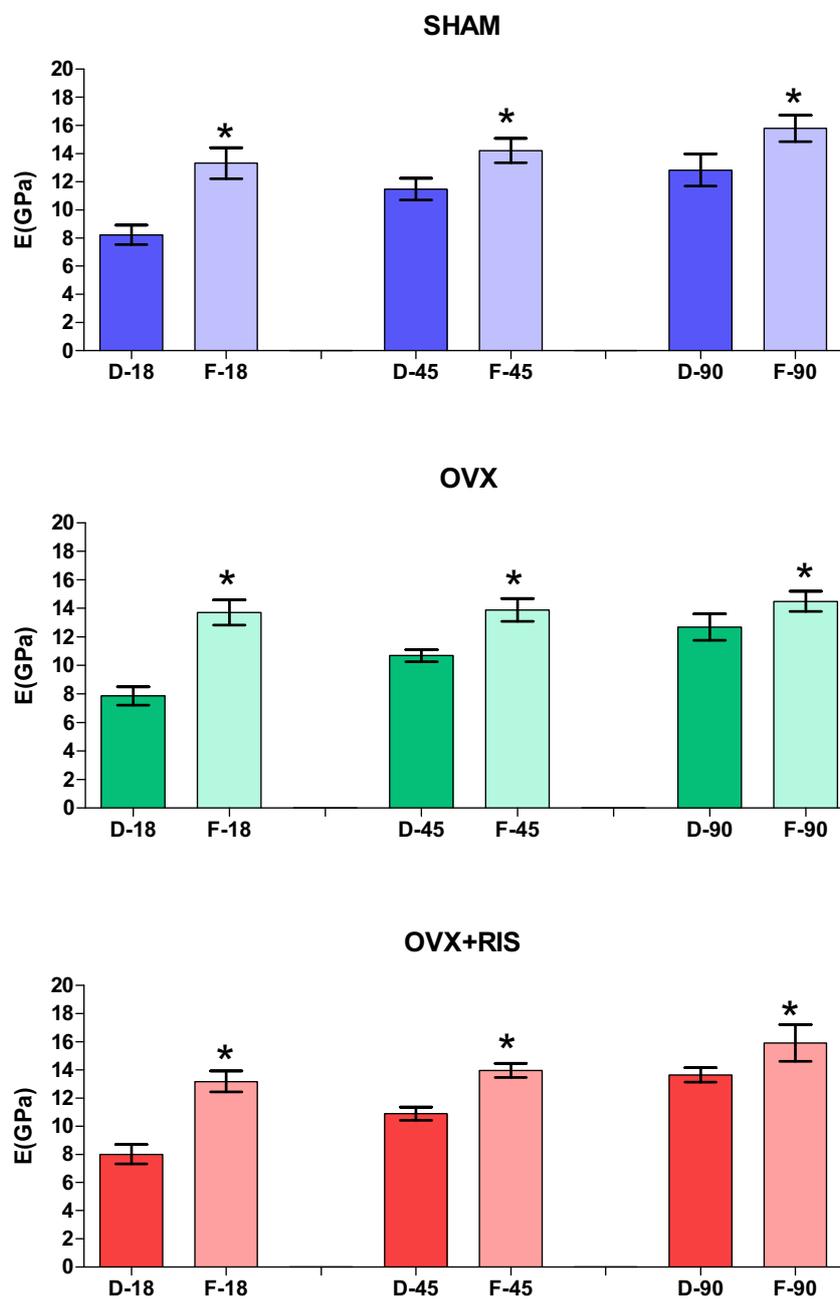


Figura 23 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de módulo de elasticidade (E) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = $p < 0,05$)

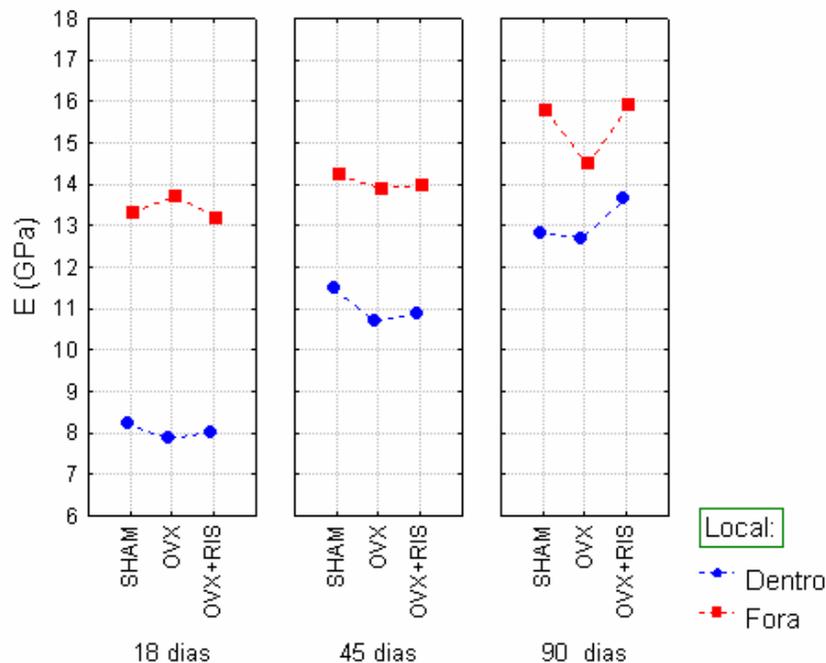


Figura 24 – Gráfico de médias dos valores de módulo de elasticidade (E) obtidos em todos os grupos, considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo no osso reparado, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,5568$) e no fator principal ovariectomia ($p=0,0893$), rejeitando a hipótese de desigualdade entre os grupos SHAM e OVX (Figura 25). O fator tempo foi o único que mostrou significância individualmente ($p=0,0000$).

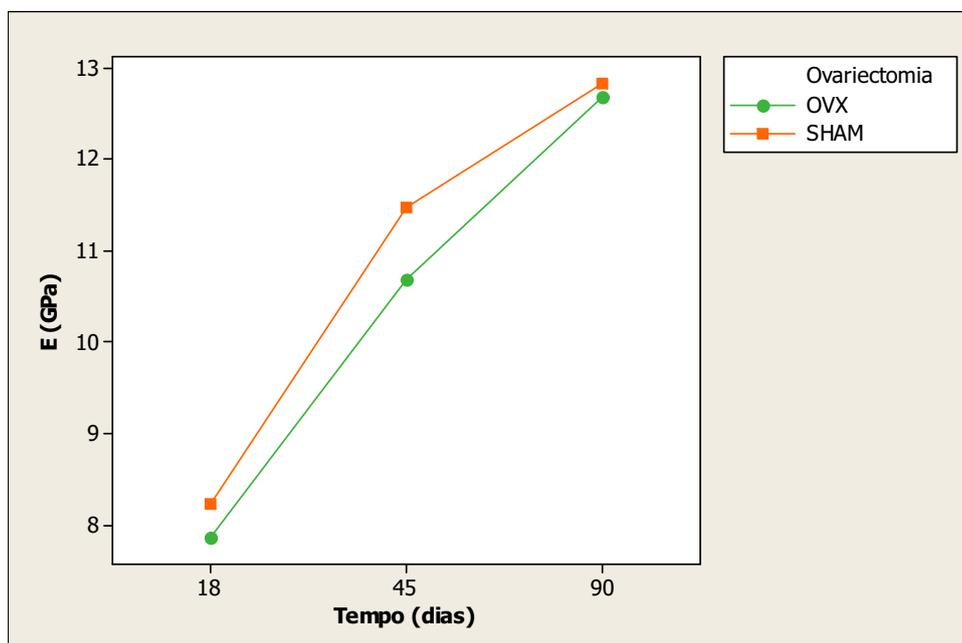


Figura 25 – Gráfico das médias do módulo de elasticidade (E), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Realizado o Teste de Tukey para o fator tempo (Tabela 8) verificou-se a formação de três grupos homogêneos com valores crescentes com o aumento do tempo de reparo.

Tabela 8 – Representação das médias do módulo de elasticidade (E) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média E	Grupos Homogêneos
90	12,762	A
45	11,079	B
18	8,043	C

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e

tempo de reparo na reparação óssea, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores tratamento x tempo ($p=0,1858$), somente nos fatores principais tempo ($p=0,0000$) e tratamento ($p=0,0310$), com o grupo OVX+RIS apresentando média superior (10,851) à do grupo OVX (10,414) (Figura 26).

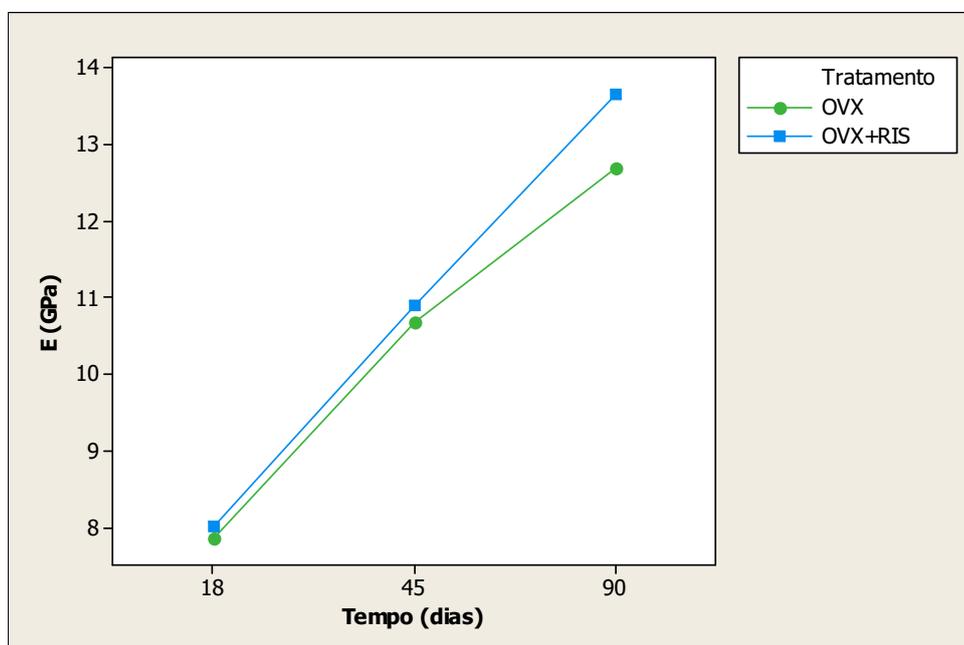


Figura 26 – Gráfico das médias do módulo de elasticidade (E), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para o fator tempo (Tabela 9) verificou-se a formação de três grupos homogêneos com valores crescentes com o aumento do tempo de reparo.

Tabela 9 – Representação das médias do módulo de elasticidade (E) dos grupos, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média E	Grupos Homogêneos
90	13,171	A
45	10,791	B
18	7,935	C

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

5.4 Concentração de cálcio

Os dados referentes à estatística descritiva são apresentados na Tabela 10 e representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas (Figura 27).

As médias de todos os grupos, tanto dentro como fora do defeito ósseo, aumentaram com o aumento do tempo de reparo, mas com menor variação nas médias obtidas fora do calo ósseo.

Observou-se que as médias dentro do calo ósseo foram menores que aquelas obtidas fora do mesmo em todos os grupos, com exceção do grupo OVX, aos noventa dias, que apresentou a média dos valores de concentração de Ca maiores dentro do calo ósseo. Essas diferenças foram estatisticamente significantes, quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p < 0,05$), somente nas situações apresentadas na Tabela 11.

Tabela 10 – Média e desvio-padrão dos dados de concentração do Ca (% peso) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo)

Tempo de Reparo	n	Ca (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		Dentro	Fora	Dentro	Fora	Dentro	Fora
18	7	15,620 ±1,936	25,597 ±0,866	12,468 ±1,395	25,850 ±1,248	14,517 ±2,007	28,847 ±2,587
45	7	25,850 ±0,586	27,123 ±0,835	26,851 ±1,270	27,315 ±1,249	26,820 ±1,394	28,894 ±1,127
90	7	28,892 ±1,553	29,498 ±1,818	29,025 ±1,152	28,898 ±0,939	28,616 ±2,941	30,142 ±1,237

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = Sham + água

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

Tabela 11 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de concentração do Ca obtidas dentro e fora do calo ósseo com o teste *t-Student* pareado

Grupo	p
SHAM 18 dias	0,000*
SHAM 45 dias	0,000*
OVX 18 dias	0,000*
OVX+RIS 18 dias	0,000*
OVX+RIS 45 dias	0,009*

* p<0,05

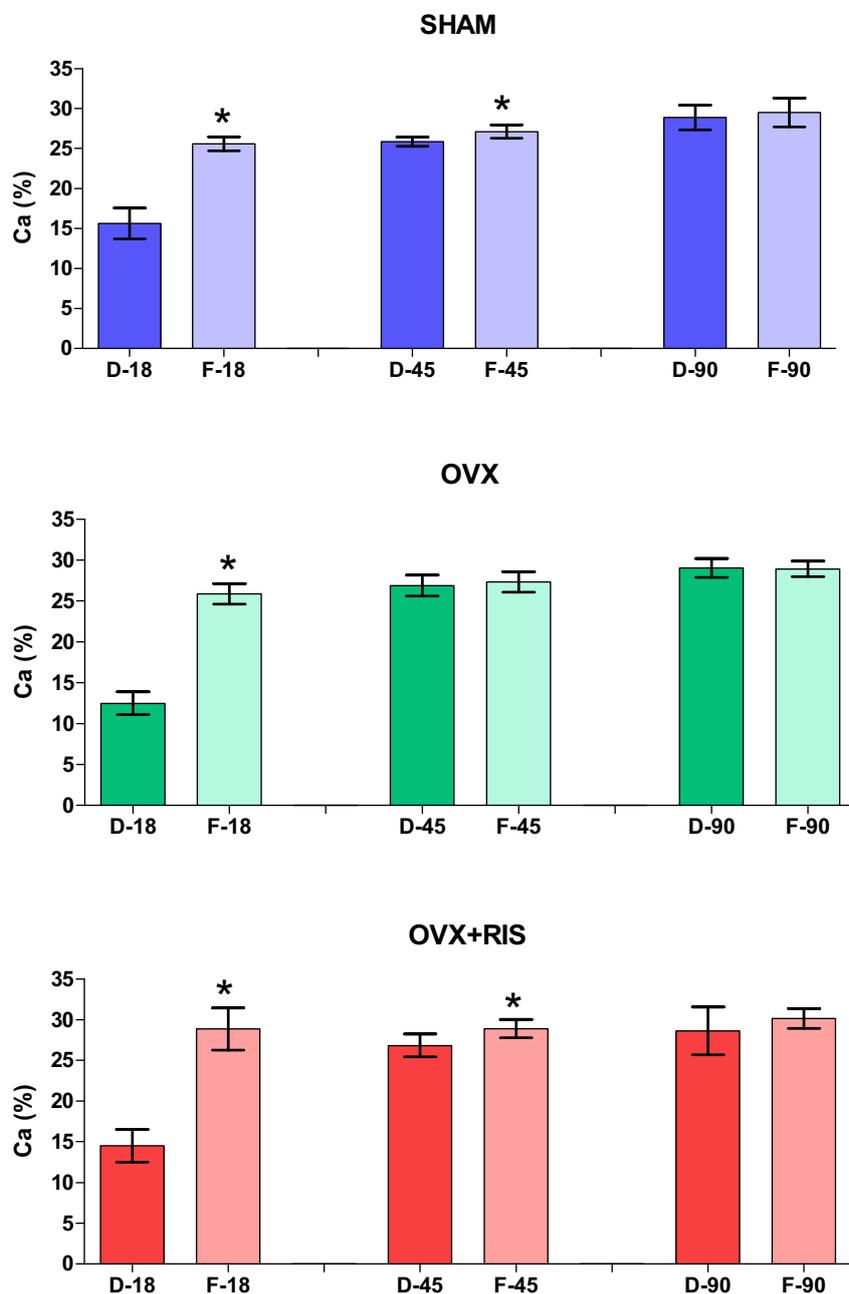


Figura 27 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores do percentual de cálcio (Ca) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = $p < 0,05$)

As diferenças entre as médias encontradas dentro e fora do calo ósseo foram maiores aos 18 dias (Figuras 28 e 29) e estas diferenças diminuíram significativamente nos períodos de reparo posteriores. Os grupos SHAM e OVX+RIS deixaram de apresentar diferenças estatisticamente significantes entre os valores de concentração de cálcio dentro e fora do calo ósseo aos noventa dias e o grupo OVX já não apresentou essa diferença aos 45 dias.

O fator tempo interferiu mais nos valores encontrados dentro do calo ósseo que no osso preexistente, fora do calo ósseo.

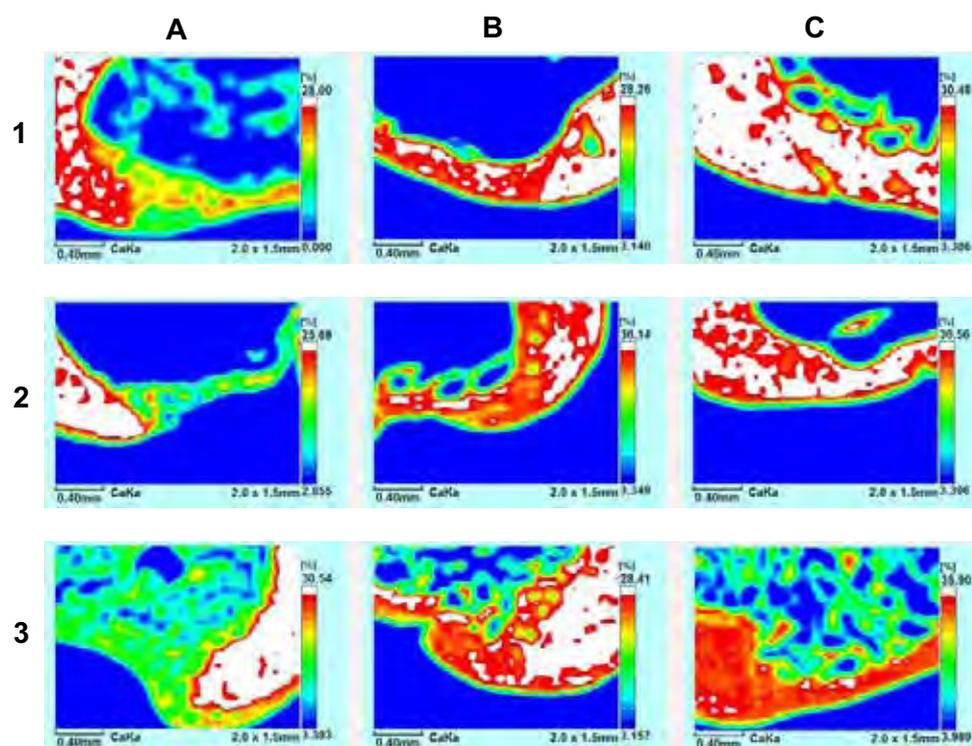


Figura 28 – Imagens do mapeamento de Ca (% peso) por μ ED-XRF de todas as condições experimentais. Linhas 1, 2 e 3 =Grupo SHAM, OVX e OVX+RIS, respectivamente. Colunas A, B e C = 18, 45 e noventa dias, respectivamente.

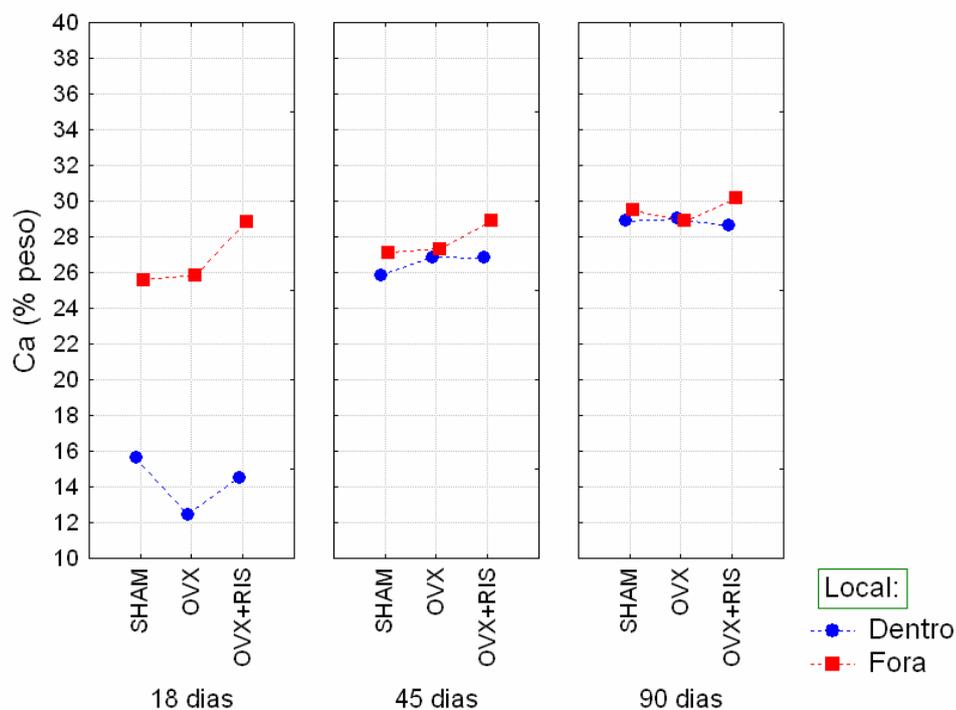


Figura 29 – Gráfico de médias dos valores de concentração do Ca (% peso) obtidos nos grupos SHAM e OVX, considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo no osso reparado, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise foi verificada significância na interação entre fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,0008$).

Realizado o teste de Tukey para a interação (Tabela 12) verificou-se que o grupo homogêneo dos maiores valores foi encontrado aos noventa dias, sem diferenças significativas entre os grupos SHAM e OVX. Só houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHAM e OVX no período de 18 dias (Figura 30).

No grupo SHAM as médias foram crescentes e estatisticamente diferentes com o aumento do tempo de reparo e no

grupo OVX as médias encontradas aos 18 dias diferiram daquelas dos demais períodos analisados.

Tabela 12 – Representação das médias da concentração do cálcio (% peso) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) da interação entre os fatores ovariectomia X tempo

Ovariectomia	Tempo de Reparo (dias)	Média Ca	Grupos Homogêneos
SHAM	18	15,620	C
OVX	18	12,468	D
SHAM	45	25,850	B
OVX	45	26,851	A B
SHAM	90	28,892	A
OVX	90	29,025	A

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

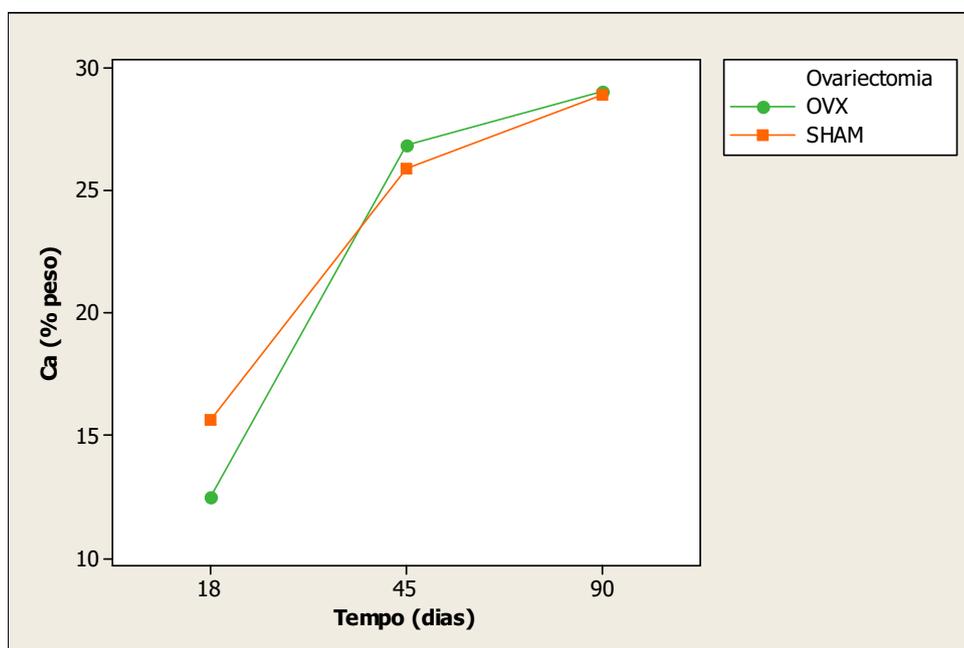


Figura 30 – Gráfico das médias de concentração de Ca (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo na reparação óssea, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores tratamento x tempo de reparo ($p=0,1664$) e no fator principal tratamento, rejeitando a hipótese de desigualdade dos grupos OVX e OVX+RIS (Figura 31). Houve significância somente no fator principal tempo ($p=0,0000$).

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para o fator tempo (Tabela 13) verificou-se a formação de três grupos homogêneos com valores crescentes com o aumento do tempo de reparo.

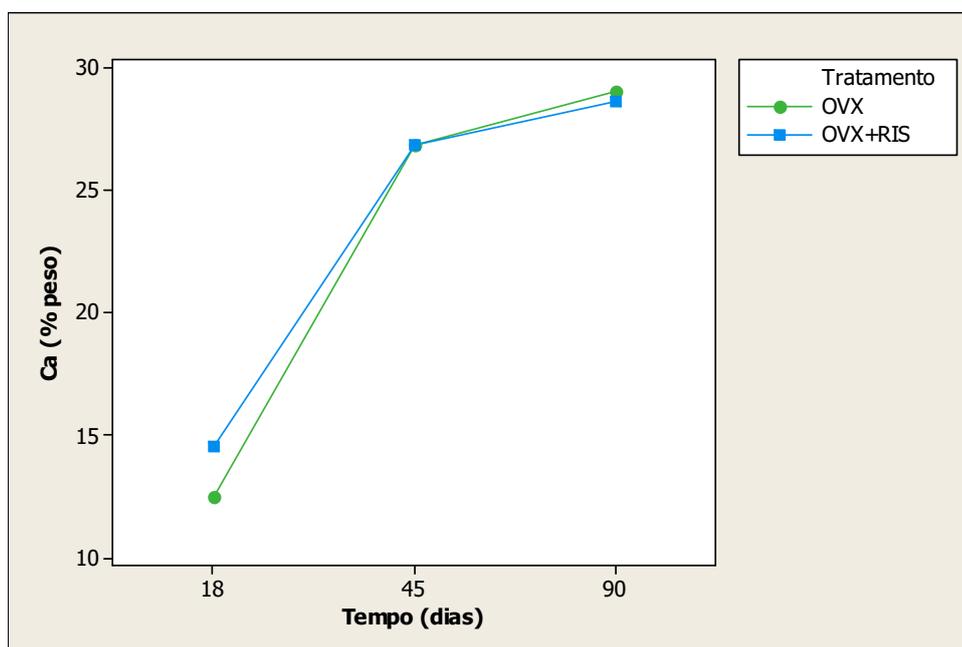


Figura 31 – Gráfico das médias de concentração de Ca (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Tabela 13 – Representação das médias do módulo da concentração do cálcio (% peso) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média Ca	Grupos Homogêneos
90	28,820	A
45	26,835	B
18	13,493	C

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

5.5 Concentração de fósforo

Os dados referentes à estatística descritiva são apresentados na Tabela 14 e representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas (Figura 32).

As médias de todos os grupos, tanto dentro como fora do defeito ósseo, aumentaram com o aumento do tempo de reparo, mas com menor variação nas médias obtidas fora do calo ósseo.

Observou-se que as médias dentro do calo ósseo foram menores que aquelas obtidas fora do mesmo em todos os grupos. Essas diferenças foram estatisticamente significantes, quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p < 0,05$), nas situações apresentadas na Tabela 15.

Tabela 14 – Média e desvio-padrão dos dados de concentração do P (% peso) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo)

Tempo de Reparo	n	P (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		Dentro	Fora	Dentro	Fora	Dentro	Fora
18	7	8,296 ±0,881	13,771 ±0,496	6,967 ±0,639	13,880 ±0,490	7,732 ±1,050	15,029 ±1,135
45	7	13,508 ±0,354	14,330 ±0,575	13,515 ±0,593	14,468 ±0,549	13,697 ±0,511	15,211 ±0,457
90	7	14,815 ±0,846	15,390 ±1,029	14,653 ±0,545	14,976 ±0,503	14,069 ±1,678	15,425 ±0,595

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = Sham + água

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

Tabela 15 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de concentração do P obtidas dentro e fora do calo ósseo com o teste *t-Student* pareado

Grupo	p
SHAM 18 dias	0,000*
SHAM 45 dias	0,003*
OVX 18 dias	0,000*
OVX 45 dias	0,000*
OVX+RIS 18 dias	0,000*
OVX+RIS 45 dias	0,003*

* p<0,05

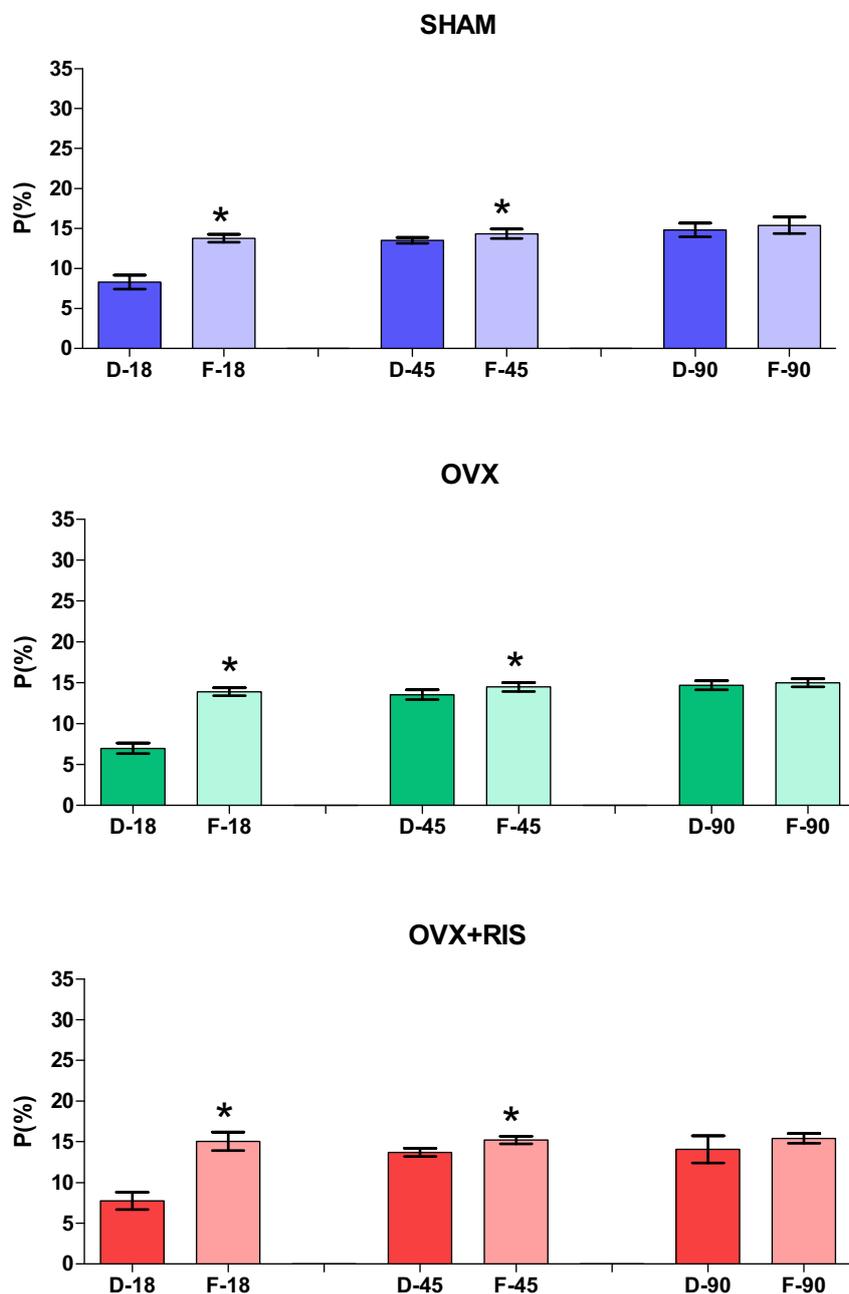


Figura 32 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores do percentual de fósforo (P) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = $p < 0,05$)

As diferenças entre as médias encontradas dentro e fora do calo ósseo foram maiores aos 18 dias e diminuíram significativamente nos períodos de reparo posteriores (Figuras 33 e 34), deixando de apresentar diferenças estatisticamente significantes aos noventa dias, em todos os grupos.

O fator tempo interferiu mais nos valores encontrados dentro do calo ósseo que no osso preexistente, fora do calo ósseo.

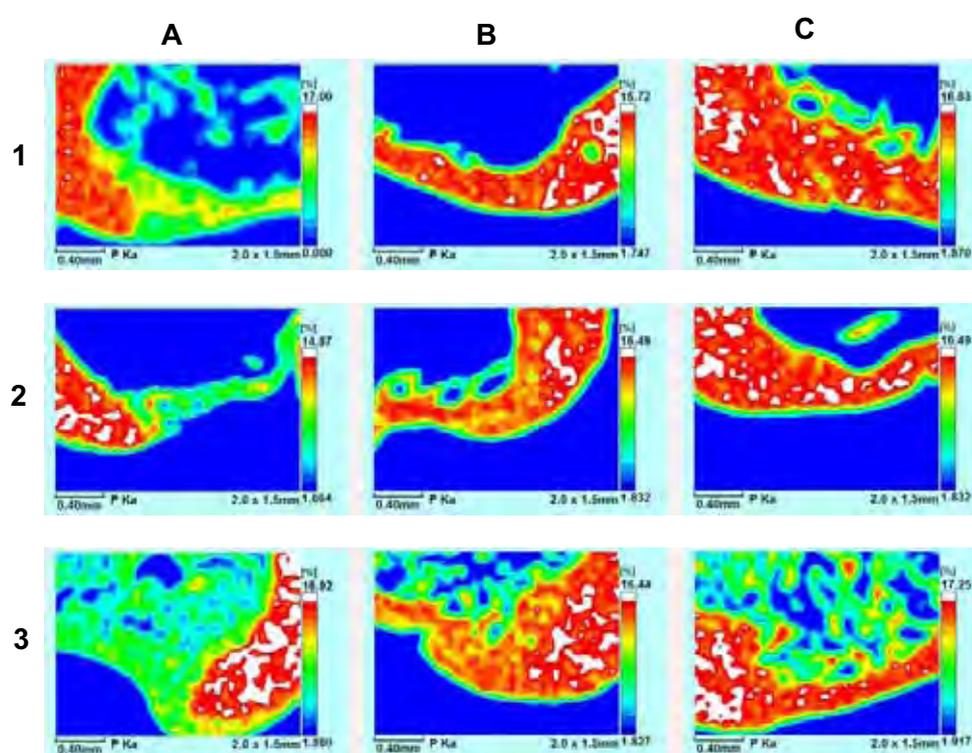


Figura 33 – Imagens do mapeamento de P (% peso) por μ ED-XRF de todas as condições experimentais. Linhas 1, 2 e 3 =Grupo SHAM, OVX e OVX+RIS, respectivamente. Colunas A, B e C = 18, 45 e noventa dias, respectivamente.

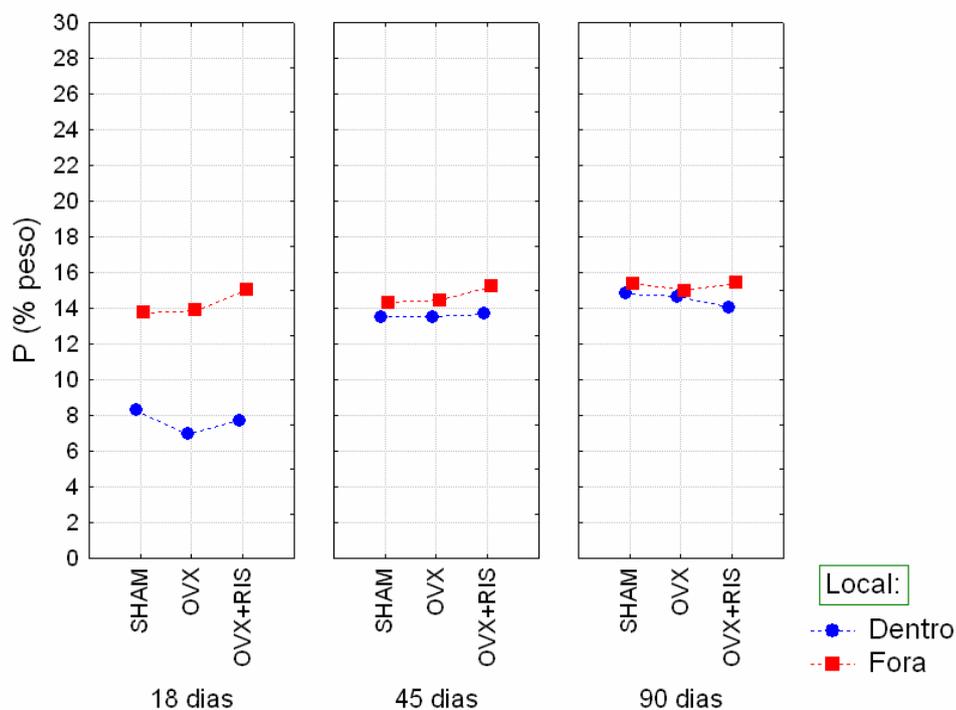


Figura 34 – Gráfico de médias dos valores de concentração do P (% peso) obtidos nos grupos SHAM e OVX, considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo no osso reparado, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise foi verificada significância na interação entre fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,0237$).

Realizado o teste de Tukey para a interação (Tabela 16) verificou-se que o grupo homogêneo dos maiores valores foi encontrado aos noventa dias, sem diferenças significativas entre os grupos SHAM e OVX. Só houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHAM e OVX aos 18 dias.

As médias dos dois grupos foram crescentes e com diferenças estatisticamente significantes nos períodos de tempo

analisados (Figura 35).

Tabela 16 – Representação das médias da concentração do P (% peso) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) da interação entre os fatores ovariectomia X tempo

Ovariectomia	Tempo de Reparo (dias)	Média P	Grupos Homogêneos
SHAM	18	8,296	C
OVX	18	6,967	D
SHAM	45	13,508	B
OVX	45	13,515	B
SHAM	90	14,815	A
OVX	90	14,653	A

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

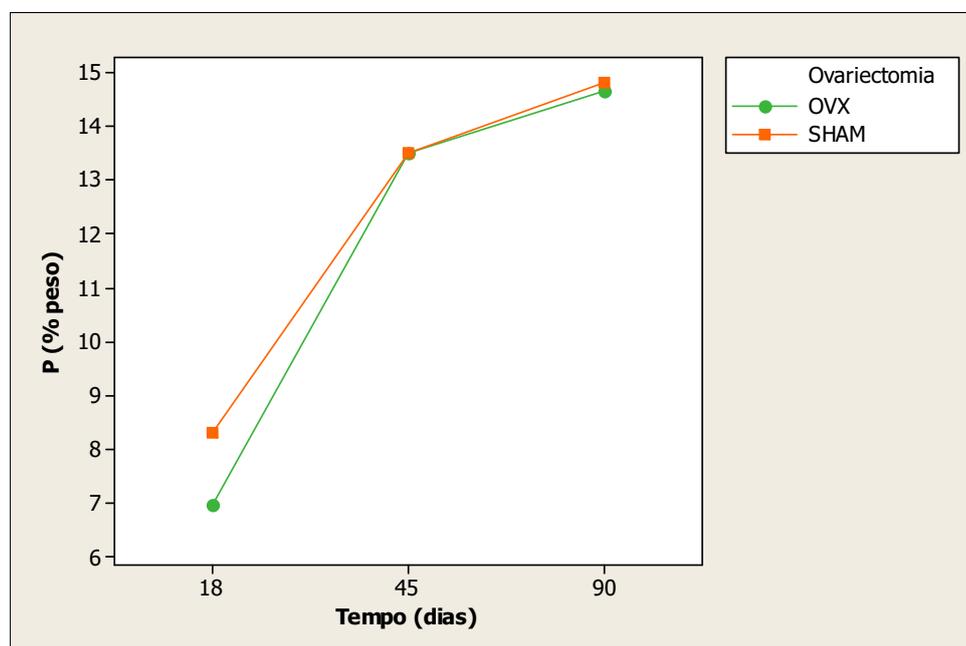


Figura 35 – Gráfico das médias de concentração de P (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos SHAM e OVX aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa entre os grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo, na reparação óssea, foi realizada a análise de variância ANOVA para estes fatores considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores tratamento x tempo ($p=0,1741$) e fator principal tratamento ($p=0,6762$), rejeitando a hipótese de desigualdade entre os grupo OVX e OVX+RIS (Figura 36). Houve significância somente no fator principal tempo ($p=0,0000$).

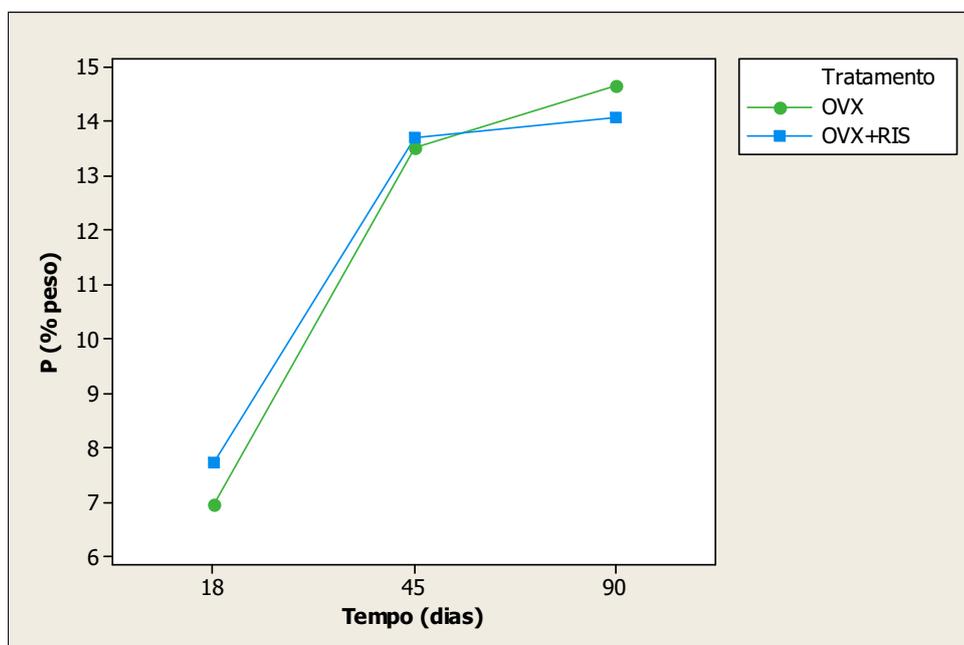


Figura 36 – Gráfico das médias de concentração de P (% peso), dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para o fator tempo (Tabela 17) verificou-se a formação de dois grupos homogêneos, com os maiores valores compreendendo os períodos de reparo de noventa e 45 dias.

Tabela 17 – Representação das médias do módulo da concentração do fósforo (% peso) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média P	Grupos Homogêneos
90	14.361	A
45	13.606	A
18	7.349	B

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

5.6 Relação Ca/P

Os dados referentes à estatística descritiva são apresentados na Tabela 18 e representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas (Figura 37).

As médias de todos os grupos, tanto dentro como fora do defeito ósseo, tiveram pouca variação com o aumento do período de tempo analisado.

Observou-se que as médias dentro do calo ósseo foram muitas vezes maiores do que aquelas encontradas fora do calo ósseo (Figura 36). Essas diferenças foram estatisticamente significantes, quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p < 0,05$), nas situações apresentadas na Tabela 19.

O grupo SHAM não apresentou diferenças estatisticamente significantes dos valores da relação Ca/P dentro e fora do calo ósseo em nenhum período de estudo analisado.

Os grupos OVX e OVX+RIS apresentaram, dentro do calo ósseo, valores maiores e com diferenças estatisticamente significantes, daqueles obtidos no osso preexistente aos 45 e noventa dias (Figura 38).

Tabela 18 – Média e desvio-padrão dos dados da relação Ca/P segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e região analisada (dentro ou fora do calo ósseo)

Tempo de Reparo	n	Ca/P (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		Dentro	Fora	Dentro	Fora	Dentro	Fora
18	7	1,8807 ±0,0736	1,8591 ±0,0338	1,7893 ±0,0934	1,8619 ±0,0378	1,8787 ±0,1012	1,9180 ±0,0535
45	7	1,9141 ±0,0410	1,8934 ±0,0301	1,9873 ±0,0684	1,8874 ±0,0233	1,9577 ±0,0578	1,8996 ±0,0425
90	7	1,9507 0,0285±	1,9173 ±0,0325	1,9809 ±0,0362	1,9299 ±0,0224	2,0390 ±0,0685	1,9543 ±0,0427

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = *Sham* + água

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

Tabela 19 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre os valores da relação Ca/P obtidas dentro e fora do calo ósseo com o teste *t-Student* pareado

Grupo	p
OVX 45 dias	0,010*
OVX 90 dias	0,005*
OVX+RIS 45 dias	0,003*
OVX+RIS 90 dias	0,027*

*p<0,05

O fator tempo interferiu mais nos valores encontrados no grupo OVX do que no grupo SHAM (Figura 38 e 39).

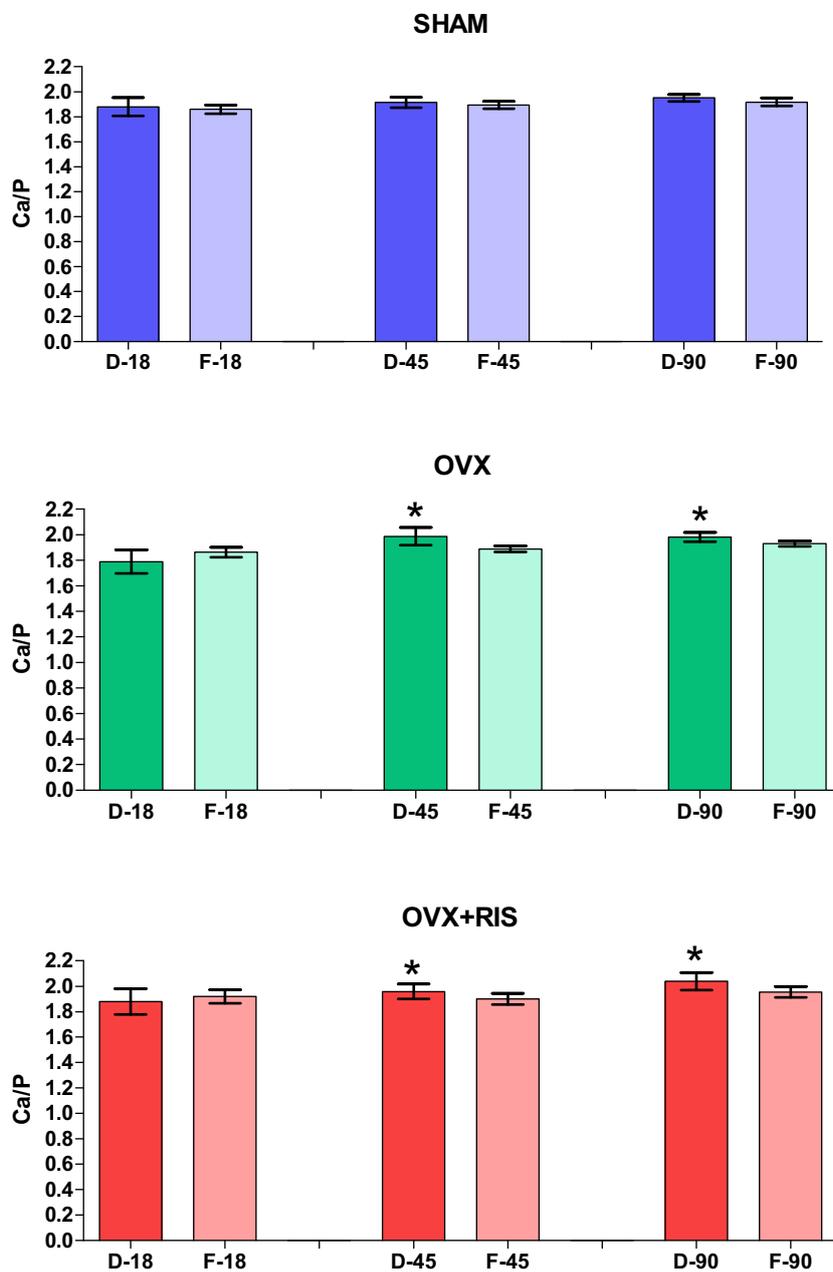


Figura 37 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores da relação Ca/P obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS) considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro (D) ou fora (F) do calo ósseo. (* = $p < 0,05$)

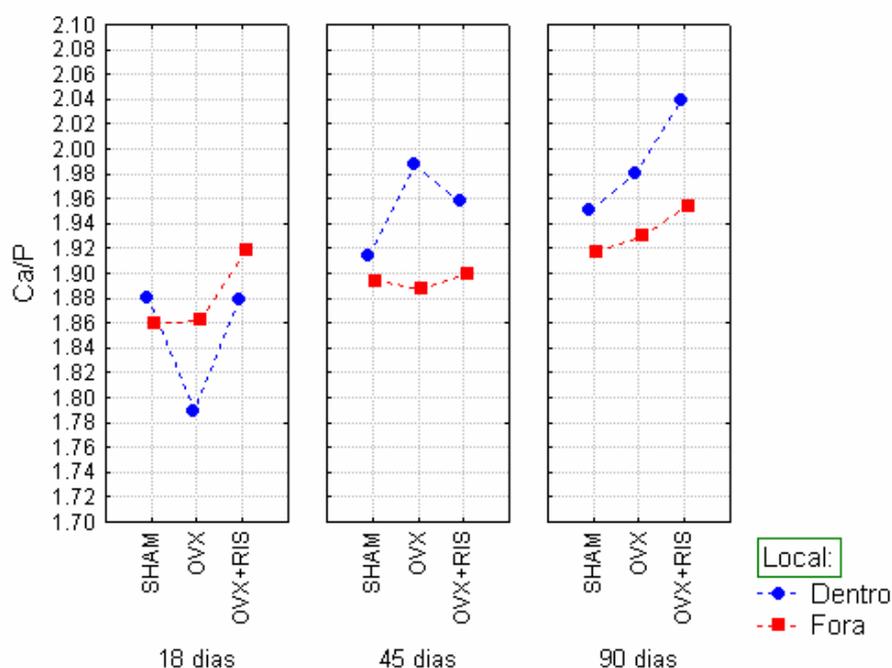


Figura 38 – Gráfico de médias dos valores da relação Ca/P obtidos em todos os grupos considerando o tempo de reparo (dias) e o local analisado, dentro e fora do calo ósseo.

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo no osso reparado, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise foi verificada significância na interação entre fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,0032$).

Realizado o teste de Tukey para a interação (Tabela 20) verificou-se a formação de um grande grupo homogêneo dos maiores valores formado pelos grupos OVX e SHAM aos 45 e noventa dias. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHAM e OVX em nenhum tempo de reparo estudado.

O grupo SHAM não apresentou médias com diferenças estatísticas em nenhum tempo de reparo enquanto no grupo OVX, aos 18 dias, essas médias foram inferiores àquelas dos 45 e noventa dias (Figura

39).

Tabela 20 – Representação das médias da relação Ca/P dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação ovariectomia x tempo

Ovariectomia	Tempo de Reparo (dias)	Média Ca/P	Grupos Homogêneos	
SHAM	18	1,8807	B	C
OVX	18	1,7893		C
SHAM	45	1,9141	A	B
OVX	45	1,9873	A	
SHAM	90	1,9507	A	B
OVX	90	1,9809	A	

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

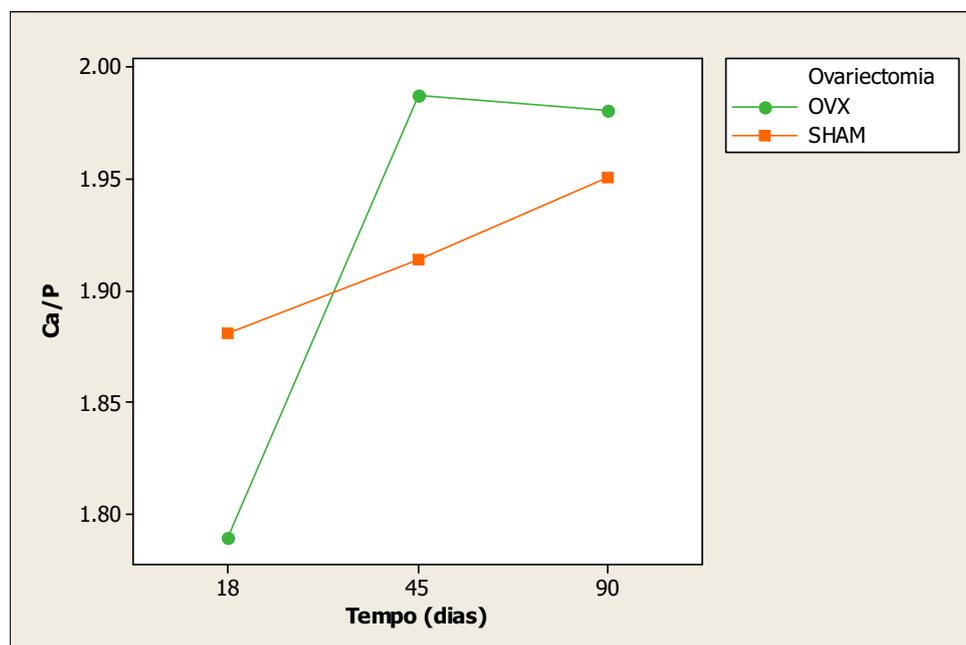


Figura 39 – Gráfico das médias da relação Ca/P, dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo na reparação óssea, foi realizada a análise de variância ANOVA considerando somente os valores encontrados dentro do calo ósseo. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre fatores tratamento x tempo de reparo ($p=0,1031$) nem no fator principal tratamento ($p=0,0943$), rejeitando a hipótese de desigualdade entre os grupo OVX e OVX+RIS (Figura 40). Houve significância somente no fator principal tempo ($p=0,0000$).

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para o fator tempo (Tabela 21) verificou-se a formação de dois grupos homogêneos, com valores os maiores compreendendo os períodos de reparo de noventa e 45 dias.

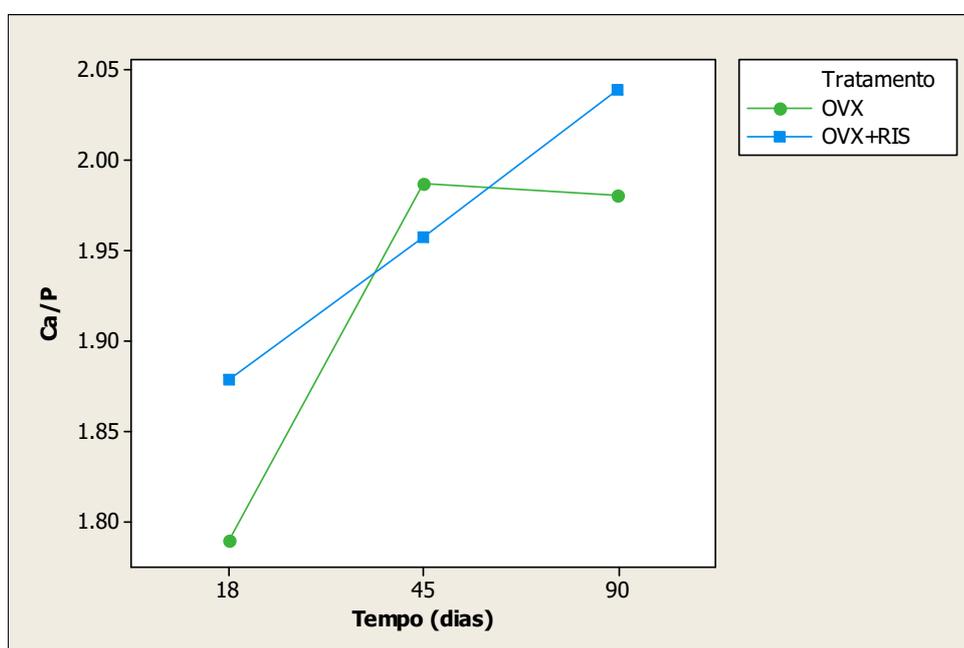


Figura 40 – Gráfico das médias da relação Ca/P, dentro do calo ósseo, dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Tabela 21 – Representação das médias da relação Ca/P dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média Ca/P	Grupos Homogêneos
90	2,0099	A
45	1,9725	A
18	1,8340	B

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

5.7 Correlação entre microdureza e mineralização ósseas

Para verificar uma possível correlação entre os valores de microdureza, encontrados no calo ósseo, e o grau de mineralização neste local e medir a força deste relacionamento linear foi realizado o teste de correlação linear de Pearson (ou Spearman). Este teste foi realizado para cada grupo separadamente e para todos os grupos juntos. Os coeficientes de correlação (r) estão apresentados na Tabela 22 e os coeficientes de determinação (r^2), assim como as equações da análise de regressão, na Tabela 23.

Tabela 22 – Valores de correlação ordinal de Pearson entre as variáveis de microdureza (HV) e as grandezas da mineralização óssea (percentual de Ca, de P e relação CA/P) e teste de significância (p -valor) para os grupos

Grandezas	r (p -valor)			
	SHAM	OVX	OVX+RIS	Todos
% Ca	0,909(0,000*)	0,862(0,000*)	0,865(0,000*)	0,869(0,000*)
% P	0,922(0,000*)	0,857(0,000*)	0,862(0,000*)	0,870(0,000*)
Ca/P	0,412(0,064)	0,651(0,001*)	0,483(0,017*)	0,516(0,000*)

* $p < 0,05$

Tabela 23 – Valores do coeficiente de determinação da análise de regressão entre as variáveis de microdureza (HV) e as grandezas da mineralização óssea (percentual de Ca, de P e relação Ca/P) e para os grupos

Grupos	Equação da Regressão para HV (r^2 [%])		
	% Ca	% P	Ca/P
SHAM	4,643+2,037Ca (82,7)	0,977+4,208P (85,1)	-107,6+83,20Ca/P (17,0)
OVX	14,55+1,541Ca (74,3)	10,95+3,286P (73,5)	-97,04+76,77Ca/P (42,3)
OVX+RIS	2,873+2,106Ca (74,9)	-0,931+4,450P (74,3)	-100,1+78,14Ca/P (23,3)
Todos	8,012+1,869Ca (75,5)	4,145+3,946P (75,7)	-96,68+76,79Ca/P (26,6)

Na análise da associação realizada para cada grupo separadamente, foi observada significância em todas as condições, com exceção da relação Ca/P, no grupo SHAM. Este mesmo grupo apresentou o mais forte relacionamento para os fatores concentração de Ca e de P (82,7 e 85,1%, respectivamente) enquanto que os outros grupos apresentaram coeficientes de determinação menores e com valores entre 73,5 e 75,7%.

A associação da microdureza com a concentração do Ca, do P e com a relação Ca/P de todos os grupos foi encontrada significância ($p=0,0000$ e $r=0,869$, $r=0,870$ e $r=0,516$, respectivamente). Essa correlação está representada através do gráfico da regressão linear (Figura 41).

Este relacionamento foi positivo e forte para os fatores concentração de Ca e de P em todas as situações analisadas e foi positivo e moderado para a relação Ca/P.

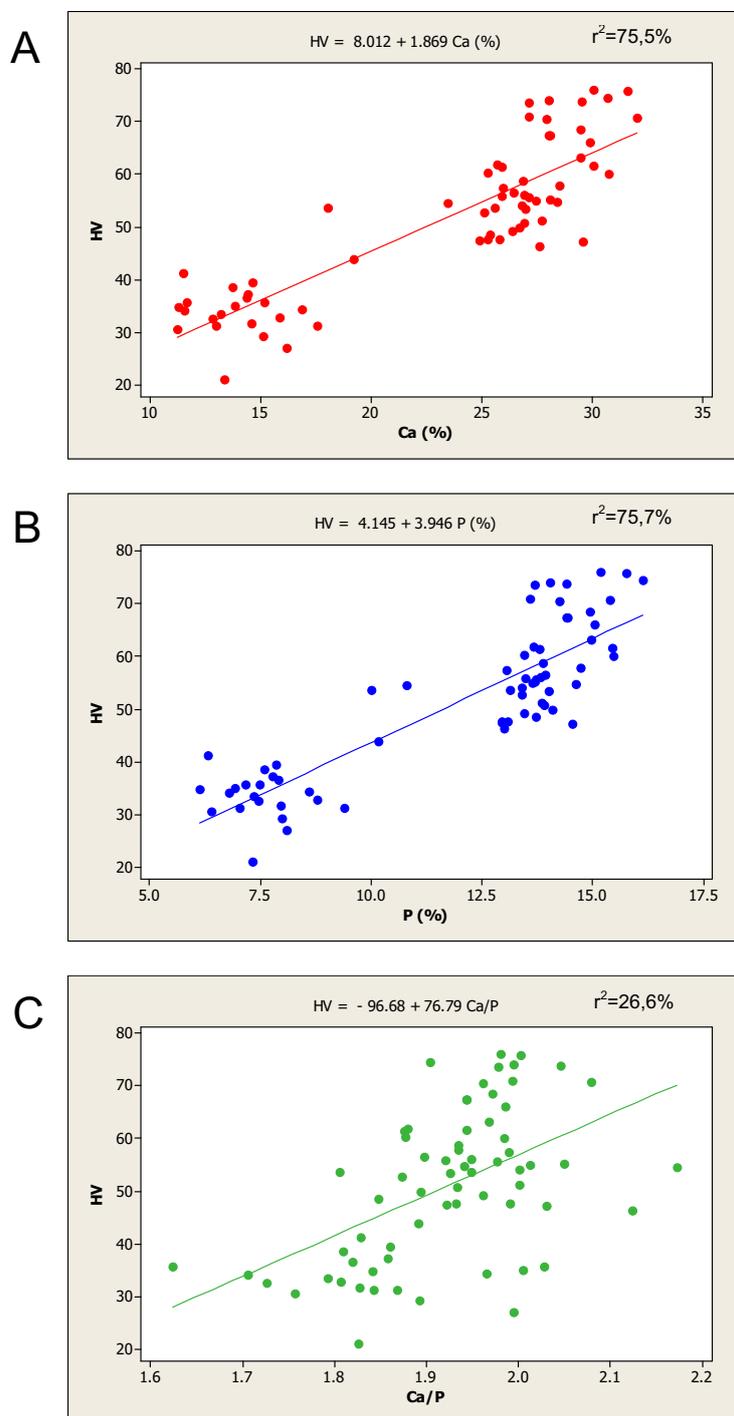


Figura 41 – Gráficos da regressão linear entre as variáveis microdureza e concentração de Ca, P e relação Ca/P de todos os grupos. A) HV x Ca. B) HV x P. C) HV x Ca/P.

5.8 Propriedades biomecânicas

A avaliação da largura médio-lateral na região da aplicação carga nos fêmures O e NO durante o teste de flexão em três pontos foi realizada através do teste *t-Student* pareado e demonstrou não haver diferenças significativas ($p=0,349>0,05$) entre as medidas (mm) dos fêmures O ($3,0066\pm 0,0247$) e NO ($2,9913\pm 0,0216$), permitindo a realização da comparação entre eles dos valores provenientes do teste de flexão aplicado.

5.8.1 Força máxima

Os dados referentes à análise descritiva estão apresentados na Tabela 24 e representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas na Figura 42.

Os grupos SHAM e OVX+RIS mostraram um comportamento semelhante, nos fêmures O, obtendo valores crescentes de força máxima com o aumento do tempo de reparo.

Considerando somente os fêmures O, observou-se sempre os maiores valores médios no grupo OVX em cada um dos tempos de reparo.

Os valores médios de força máxima dos fêmures O foram sempre menores que aqueles obtidos nos testes realizados nos fêmures contralaterais NO em todos os grupos e estas diferenças não diminuem gradativamente com o aumento do tempo de reparo (Figura 43). Essas diferenças foram estatisticamente significantes, quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p<0,05$), em todas as condições (Tabela 25).

Tabela 24 – Média e desvio-padrão dos dados de força máxima (F_u [N]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e fêmur analisado (O ou NO)

Tempo de Reparo	n	F_u (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		O	NO	O	NO	O	NO
18	7	95,43 ±22,44	154,98 ±12,25	151,4 ±33,40	186,85 ±8,61	79,83 ±18,39	184,68 ±22,70
45	7	134,31 ±20,74	181,90 ±26,70	139,04 ±19,45	193,22 ±18,24	115,70 ±27,70	175,07 ±14,88
90	7	144,00 ±36,00	215,3 ±26,70	158,74 ±17,03	209,01 ±13,55	152,59 ±18,47	214,66 ±25,20

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = *Sham* + água; OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

O = fêmur operado

NO = fêmur não-operado

Tabela 25 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de força máxima obtidas nos fêmures O e NO com o teste *t-Student* pareado

Grupo	p
SHAM 18 dias	0,001*
SHAM 45 dias	0,000*
SHAM 90 dias	0,000*
OVX 18 dias	0,036*
OVX 45 dias	0,002*
OVX 90 dias	0,000*
OVX+RIS 18 dias	0,000*
OVX+RIS 45 dias	0,000*
OVX+RIS 90 dias	0,002*

*p<0,05

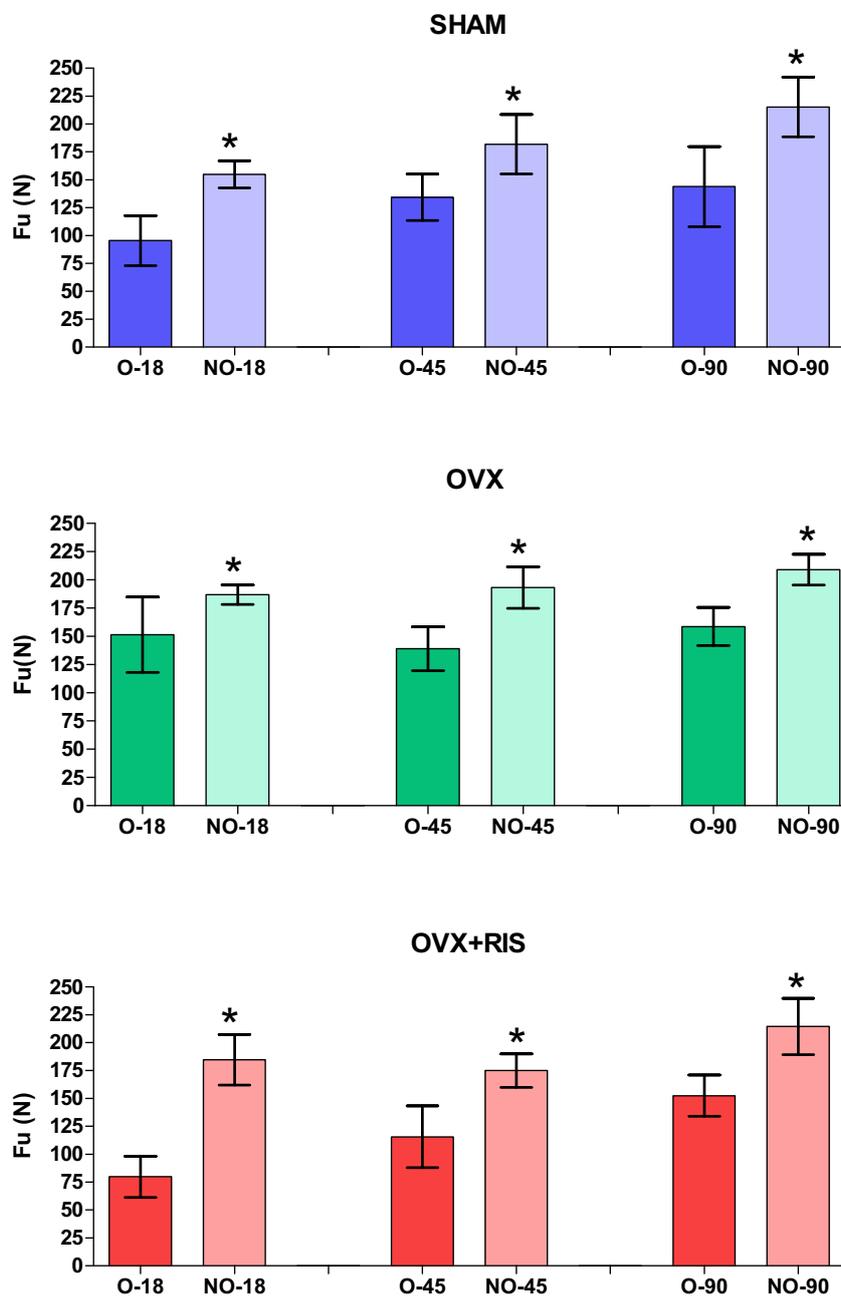


Figura 42 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de força máxima (F_u [N]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO). (* = $p < 0,05$)

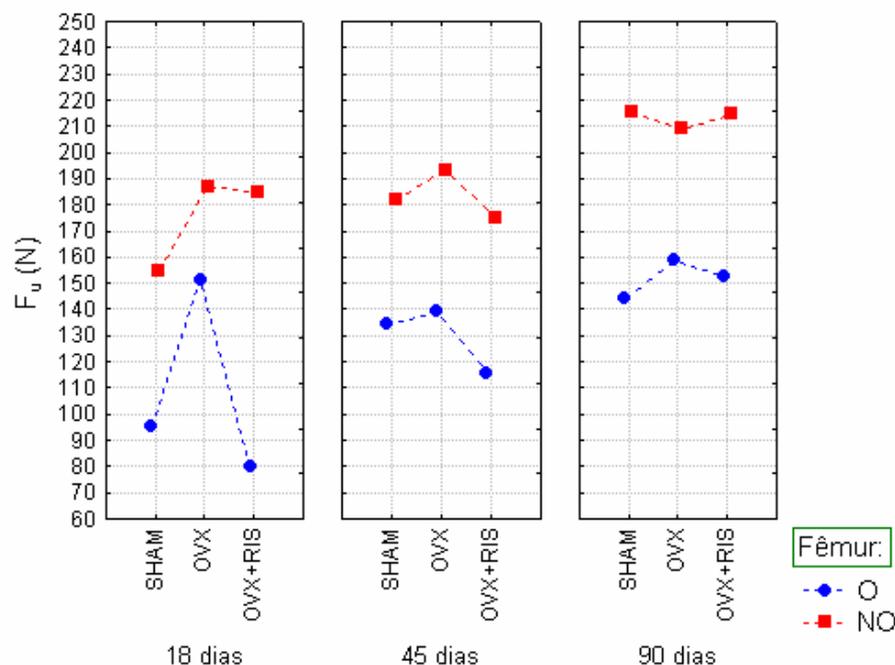


Figura 43 – Gráfico de médias dos valores de força máxima (F_u) obtidos em todos os grupos considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO).

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo nos fêmures O, foi realizada a análise de variância ANOVA. Nessa análise foi verificada significância na interação entre os fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,0303$).

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para a interação (Tabela 26) verificou-se a formação de dois grupos homogêneos, com o grupo dos valores maiores compreendendo todas as condições estudadas, com exceção do grupo SHAM aos 18 dias.

Só houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHAM e OVX no período de 18 dias (Figura 44).

O grupo OVX não variou estatisticamente suas médias

nos períodos de tempo estudados enquanto que o grupo SHAM mostrou diferenças estatísticas entre a média dos 18 dias e as dos demais períodos.

Tabela 26 – Representação das médias de força máxima dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação ovariectomia X tempo

Ovariectomia	Tempo de Reparo (dias)	Média F_u	Grupos Homogêneos
SHAM	18	95.43	B
OVX	18	151.41	A
SHAM	45	134.31	A
OVX	45	139.04	A
SHAM	90	143.98	A
OVX	90	158.74	A

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

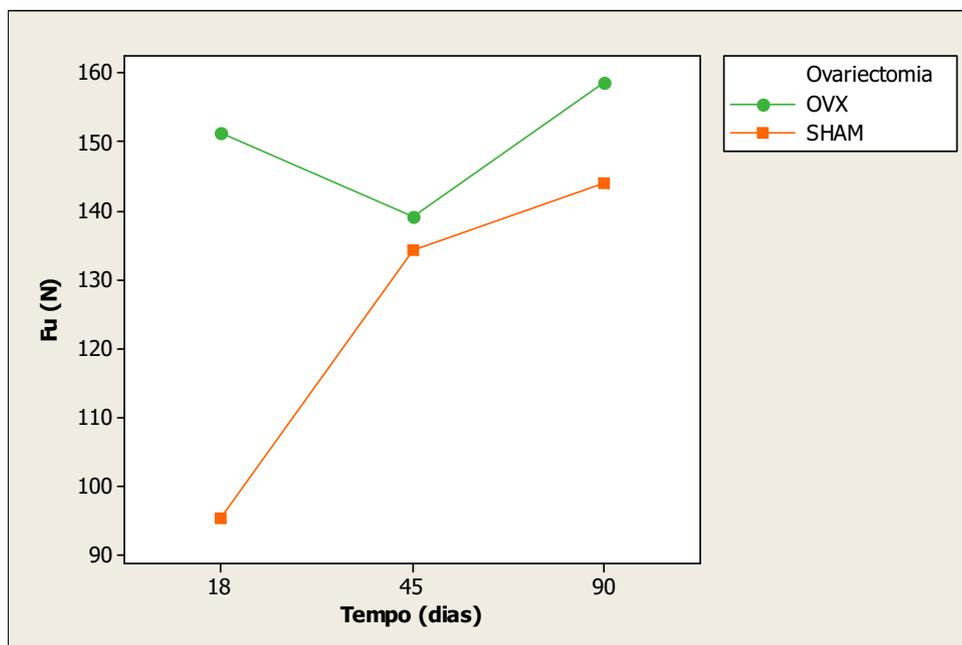


Figura 44 – Gráfico das médias da força máxima dos fêmures O dos grupos SHAM e OVX, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo no fêmur O, foi realizada a análise de variância ANOVA. Nessa análise foi verificada significância na interação entre os fatores tratamento x tempo ($p=0,0019$).

Após a realização do teste de comparação múltipla de Tukey (Tabela 27) para a interação observou-se que só houve diferenças significativas entre os tratamentos aos 18 dias (Figura 45).

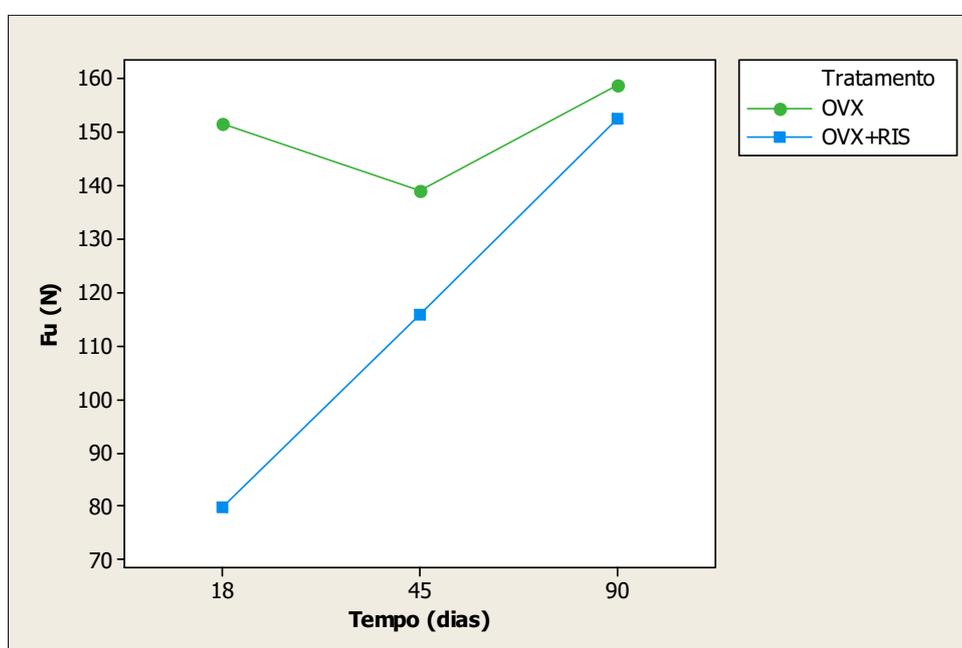


Figura 45 – Gráfico das médias da força máxima dos fêmures O dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

O grupo OVX não variou estatisticamente suas médias nos períodos de tempo estudados enquanto que o grupo OVX+RIS mostrou diferenças estatísticas entre a média dos noventa dias e a dos 18 dias.

Tabela 27 – Representação das médias de força máxima dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação tratamento x tempo de reparo

Ovariectomia	Tempo de Reparo (dias)	Média F_u	Grupos Homogêneos		
OVX	18	151,41	A	B	
OVX+RIS	18	79,83			C
OVX	45	139,04	A	B	
OVX+RIS	45	115,70		B	C
OVX	90	158,74	A		
OVX+RIS	90	152,59	A	B	

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

5.8.2 Rigidez

Os dados referentes à análise descritiva estão apresentados na Tabela 28 representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas na Figura 46.

No grupo SHAM foram observados valores médios de rigidez crescentes em relação ao aumento do tempo de reparo nos fêmures O e NO (Figura 47). O grupo OVX+RIS mostrou comportamento semelhante somente nos fêmures O.

Essa análise trouxe números elevados de desvio-padrão intragrupo, elevando o valor do coeficiente de variação em cada condição estudada, tanto nos fêmures O, quanto nos NO.

Todos os grupos mostraram, nos fêmures O, valores médios ora maiores ora menores aos encontrados nos fêmures NO para um dado tempo de reparo. Essas diferenças foram estatisticamente significantes, quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p < 0,05$), somente nas situações apresentadas na Tabela 29.

Tabela 28 – Média e desvio-padrão dos dados de rigidez (S[N/mm]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e fêmur analisado (O ou NO)

Tempo de Reparo	n	S (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		O	NO	O	NO	O	NO
18	7	286,5 ±79,7	302,6 ±74,1	356,2 ±94,0	361,3 ±60,9	246,3 ±85,6	432,6 ±70,0
45	7	390,9 ±114,5	333,3 ±189,1	315,0 ±78,7	362,5 ±129,4	352,9 ±120,8	339,4 ±152,3
90	7	433,6 ±174,3	598,9 ±171,8	449,4 ±105,9	379,0 ±70,0	503,9 ±105,9	351,7 ±152,3

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = Sham + água

OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

O = fêmur operado

NO = fêmur não-operado

Tabela 29 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de rigidez obtidas nos fêmures O e NO com o teste *t-Student* pareado

Grupo	p
SHAM 90 dias	0,045*
OVX+RIS 18 dias	0,013*
OVX+RIS 90 dias	0,013*

*p<0,05

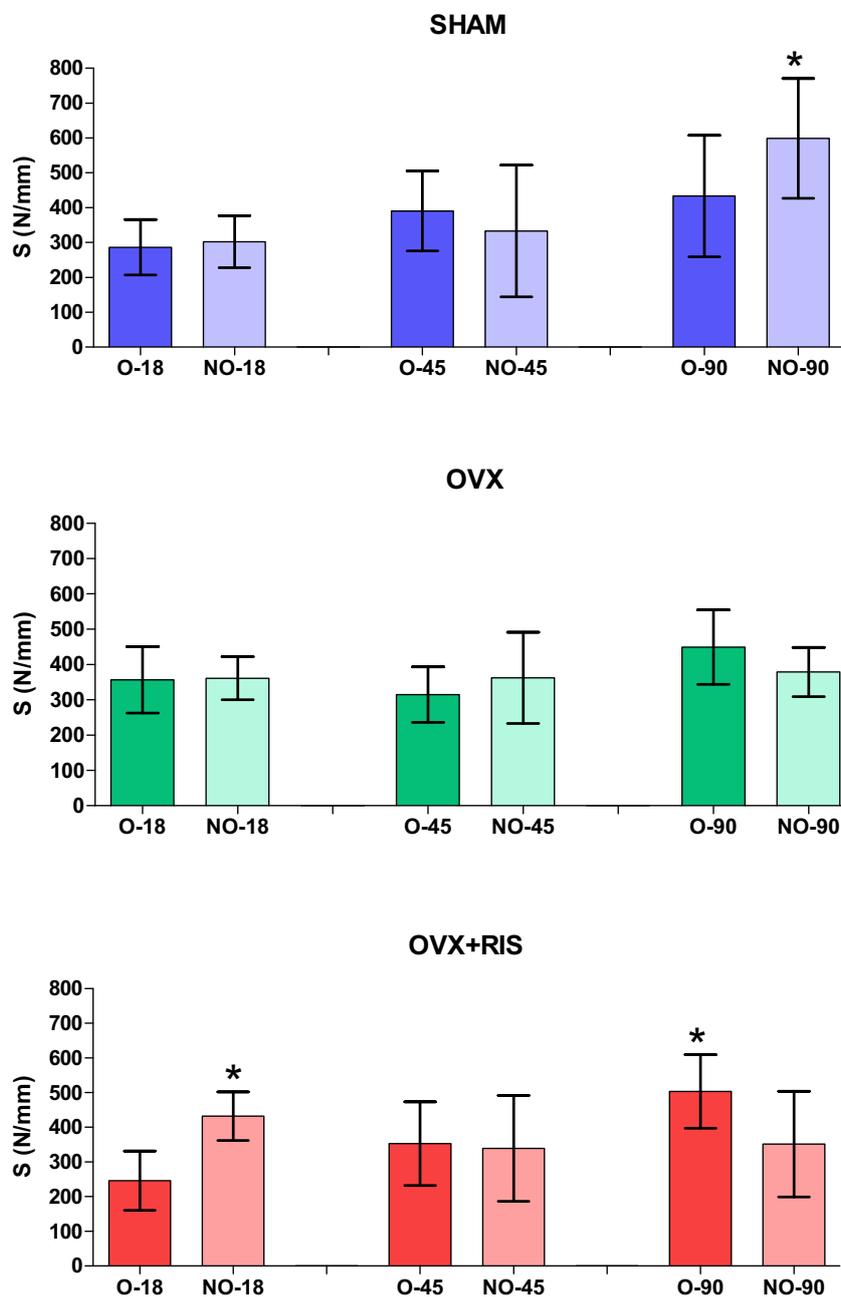


Figura 46 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de rigidez (S[N/mm]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO). (* = $p < 0,05$)

No grupo SHAM, diferenças estatisticamente significantes entre as médias encontradas nos fêmures O e NO são observadas somente aos noventa dias. Os grupos OVX e OVX+RIS apresentaram, nos fêmures O, valores ora maiores, ora menores que os fêmures NO. No grupo OVX+RIS, os fêmures O, apresentou o maior crescimento das médias com o decorrer do tempo, passando de uma condição de inferioridade, aos 18 dias, para superioridade, aos noventa dias, em relação aos fêmures NO, com diferenças estatisticamente significantes (Figura 47).

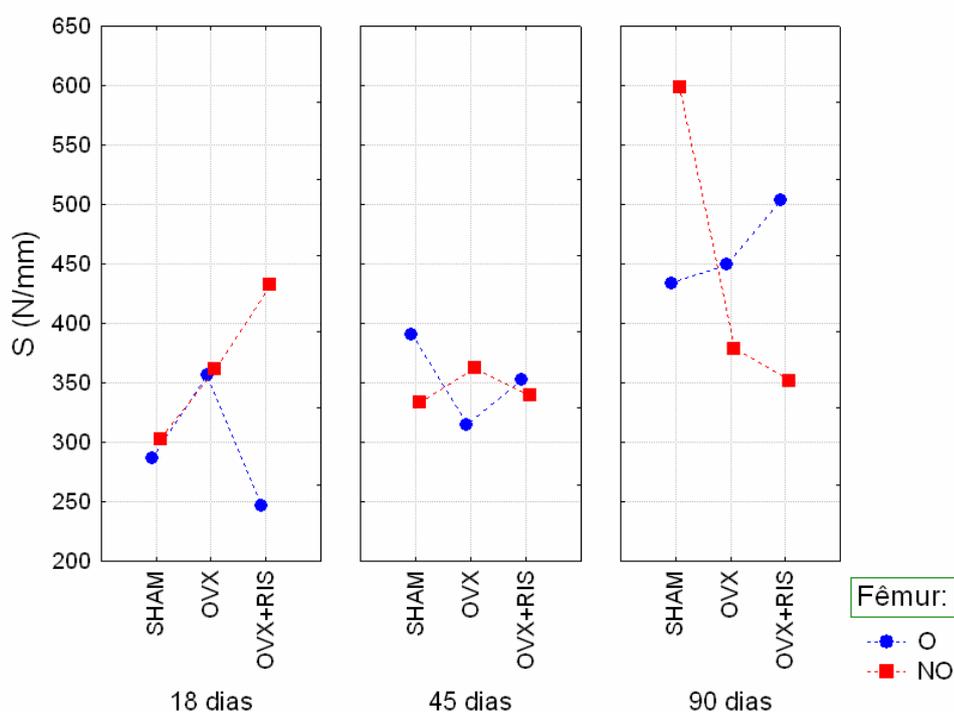


Figura 47 – Gráfico de médias dos valores de rigidez (S) de todos os grupos, considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) e não-operado (NO).

Para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo nos fêmures O, foi realizada a análise de variância ANOVA. Nessa análise não foi verificada significância na

interação entre os fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,2376$) nem no fator principal ovariectomia ($p=0,9268$), rejeitando a hipótese de desigualdade entre os grupos SHAM e OVX (Figura 48). Houve significância somente no fator principal tempo de reparo ($p=0,0215$).

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para o fator tempo (Tabela 30) verificou-se a formação de dois grupos homogêneos.

Tabela 30 – Representação das médias de rigidez (S) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média S	Grupos Homogêneos
90	441,47	A
45	352,91	A B
18	321,36	B

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

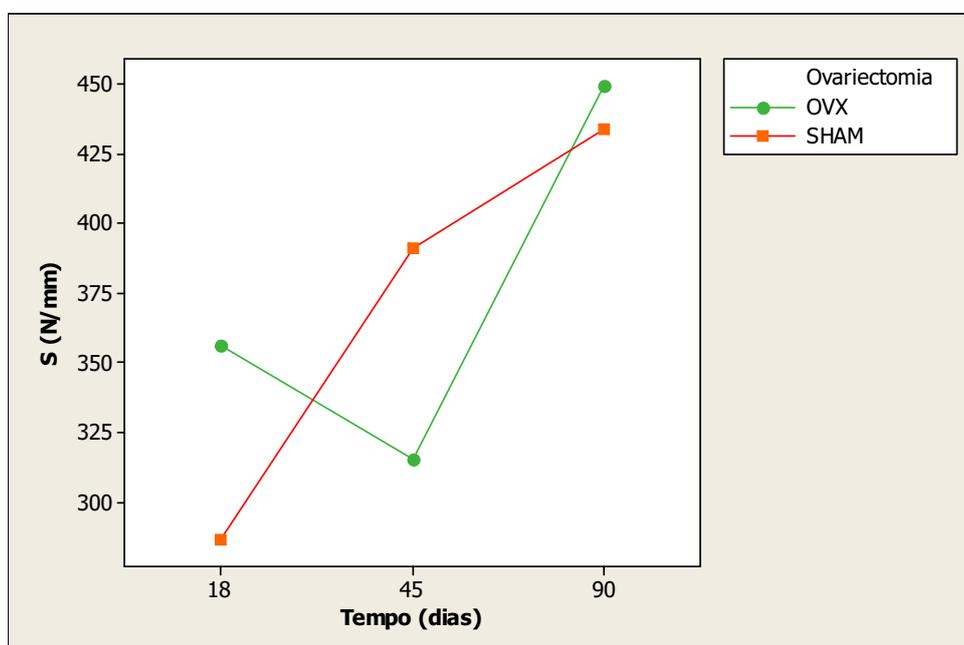


Figura 48 – Gráfico das médias da rigidez dos fêmures O dos grupos SHAM e OVX, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo no fêmur O, foi realizada a análise de variância ANOVA. Nessa análise não foi verificada significância na interação entre os fatores tratamento x tempo ($p=0,0681$) nem no fator principal tratamento ($p=0,8506$). Somente houve significância no fator principal tempo ($p=0,0001$) (Figura 49).

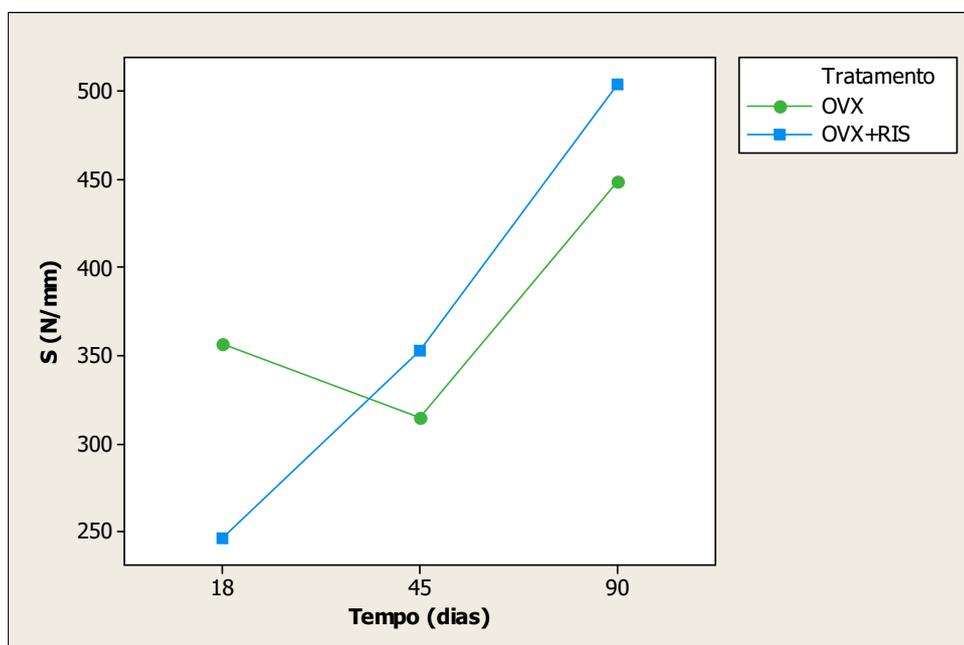


Figura 49 – Gráfico das médias da rigidez dos fêmures O dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Após a realização do teste de comparação múltipla de Tukey (Tabela 31) para o fator tempo observou-se a formação de dois grupos homogêneos, com os valores maiores para os noventa dias.

Tabela 31 – Representação das médias de rigidez (S) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) do fator tempo

Tempo de Reparo (dias)	Média S	Grupos Homogêneos
90	476,63	A
45	333,92	B
18	301,28	B

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significante

5.8.3 Energia da força máxima

Os dados referentes à análise descritiva estão apresentados na Tabela 32 representados na forma gráfica (média e desvio-padrão) mediante gráfico de colunas na Figura 50.

O grupo OVX+RIS mostrou valores crescentes de energia de força máxima com o aumento do tempo de reparo (Figura 51).

Considerando somente os fêmures O, observou-se sempre os maiores valores médios no grupo OVX em cada um dos tempos de reparo. Também nos fêmures O, foram encontrados números elevados de desvio-padrão intragrupo, elevando o valor do coeficiente de variação.

As médias de energia da força máxima dos fêmures O, de todos os grupos, foram sempre menores do que as médias encontradas nos fêmures NO. Essas diferenças foram estatisticamente significantes, quando aplicado o teste *t-Student* pareado intragrupo ($p < 0,05$) em todos os grupos (Tabela 33), mostrando valores de p bastante significativos.

Tabela 32 – Média e desvio-padrão dos dados da energia da força máxima (U[mJ]) segundo as variáveis: tratamento, tempo de reparo (dias) e fêmur analisado (O ou NO)

Tempo de Reparo	n	U (m±dp)					
		SHAM		OVX		OVX+RIS	
		O	NO	O	NO	O	NO
18	7	25,71 ±9,76	74,29 ±16,18	65,71 ±21,49	91,43 ±10,69	17,14 ±4,88	74,29 ±21,49
45	7	52,86 ±7,56	104,29 ±17,18	54,29 ±11,34	100,00 ±5,77	31,43 ±10,69	82,86 ±17,99
90	7	50,00 ±14,14	108,57 ±15,74	61,43 ±12,15	118,57 ±24,10	52,49 ±5,35	110,00 ±23,09

m±dp = média ± desvio-padrão

n = tamanho da amostra

SHAM = Sham + água; OVX = Ovariectomizado + água

OVX+RIS = Ovariectomizado + Risedronato

O = fêmur operado

NO = fêmur não-operado

Tabela 33 – Grupos que mostraram diferenças significantes na comparação intragrupo entre as medidas de energia da força máxima obtidas nos fêmures O e NO com o teste *t-Student* pareado

Grupo	p
SHAM 18 dias	0,000*
SHAM 45 dias	0,000*
SHAM 90 dias	0,000*
OVX 18 dias	0,042*
OVX 45 dias	0,000*
OVX 90 dias	0,002*
OVX+RIS 18 dias	0,000*
OVX+RIS 45 dias	0,002*
OVX+RIS 90 dias	0,001*

*p<0,05

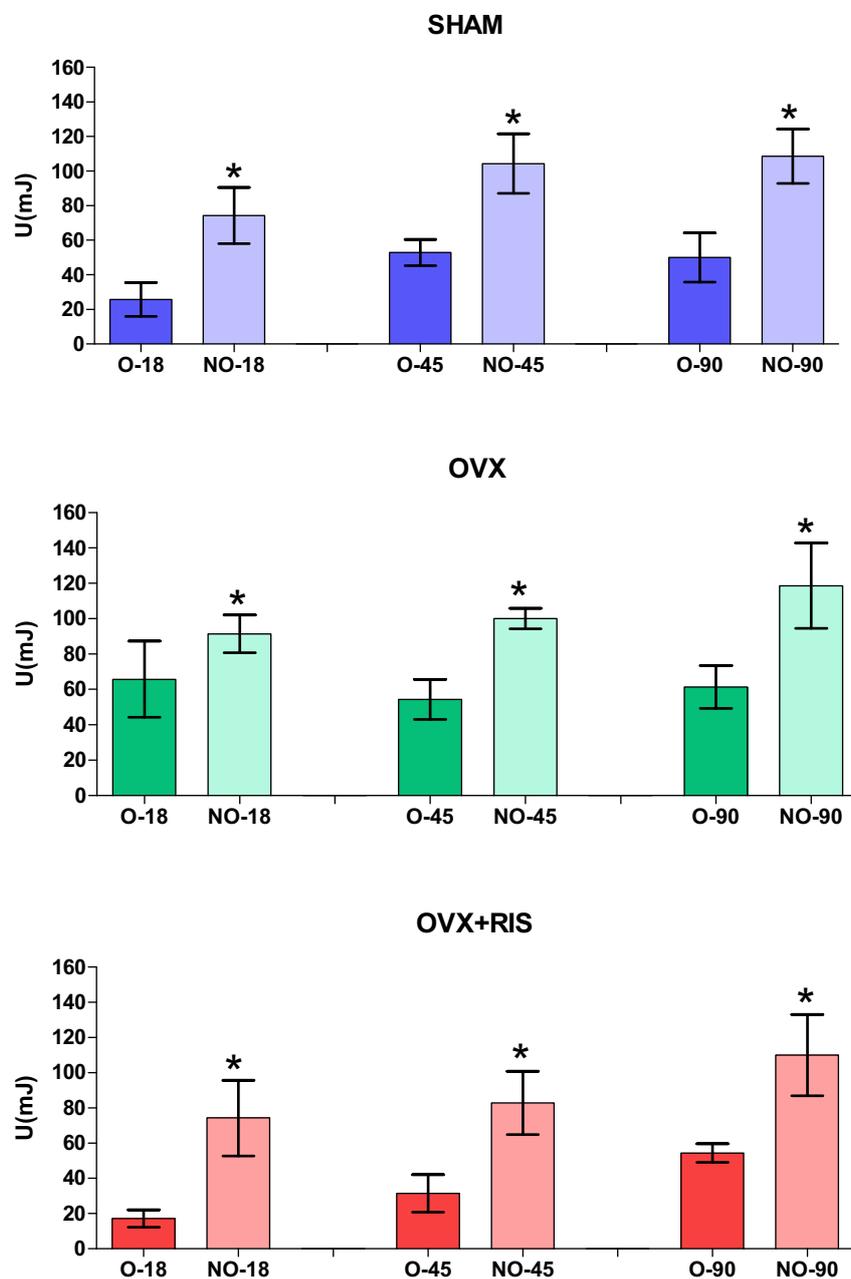


Figura 50 – Gráficos de colunas (média±desvio-padrão e significância do teste *t-Student* intragrupo) dos valores de energia da força máxima (U[mJ]) obtidos em todos os grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) ou não-operado (NO). (* = $p < 0,05$)

No grupo OVX+RIS as médias foram crescentes nos fêmures O e NO com o aumento do tempo de reparo, enquanto que nos outros dois grupos estas foram crescentes somente nos fêmures NO (Figura 51).

Considerando somente os fêmures O observou-se que os valores médios do grupo OVX foram sempre superiores aos dos outros grupos em cada tempo de reparo .

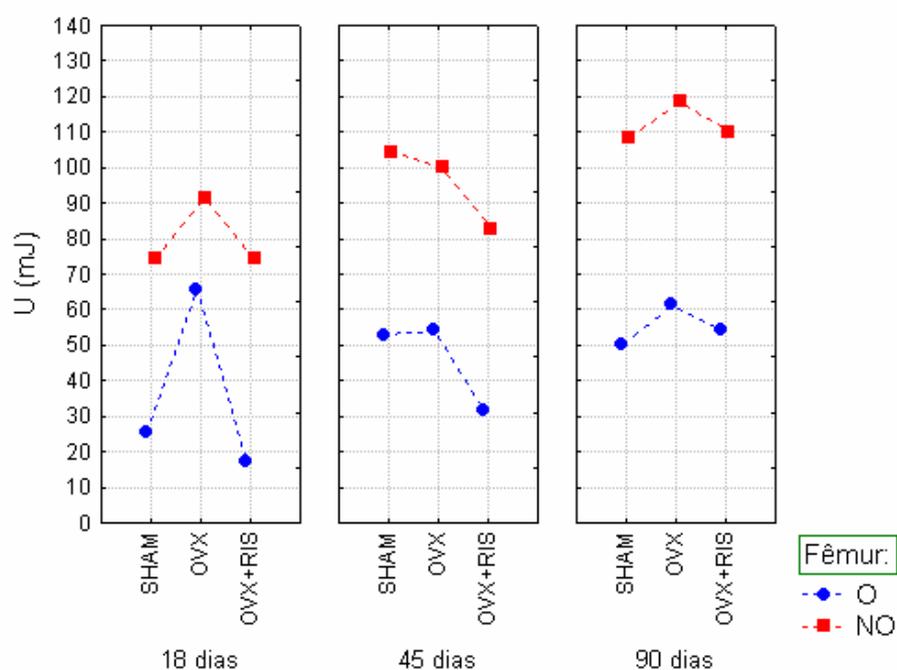


Figura 51 – Gráfico de médias dos valores de energia da força máxima (U) obtidos nos grupos SHAM e OVX, considerando o tempo de reparo (dias) e o fêmur analisado, operado (O) e não-operado (NO).

Na análise comparativa dos grupos SHAM e OVX, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores ovariectomia e tempo de reparo nos fêmures O, foi realizada a análise de variância ANOVA. Nessa análise foi verificada significância na interação entre os fatores ovariectomia x tempo de reparo ($p=0,0016$).

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para a interação (Tabela 34) verificou-se que houve diferenças significantes entre os grupos SHAM e OVX somente aos 18 dias. As médias do grupo OVX não variaram de forma estatisticamente significativa com o decorrer do tempo enquanto que as médias de SHAM tiveram os menores valores aos 18 dias e valores sem diferenças estatísticas aos 45 e noventa dias (Figura 52), igualando-se estatisticamente também ao grupo OVX.

Tabela 34 – Representação das médias de energia da força máxima (U [mJ]) dos grupos SHAM e OVX, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação ovariectomia x tempo de reparo

Ovariectomia	Tempo de Reparo (dias)	Média U	Grupos Homogêneos
OVX	18	65,71	A
SHAM	18	25,71	B
OVX	45	54,29	A
SHAM	45	52,86	A
OVX	90	61,43	A
SHAM	90	50,00	A

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

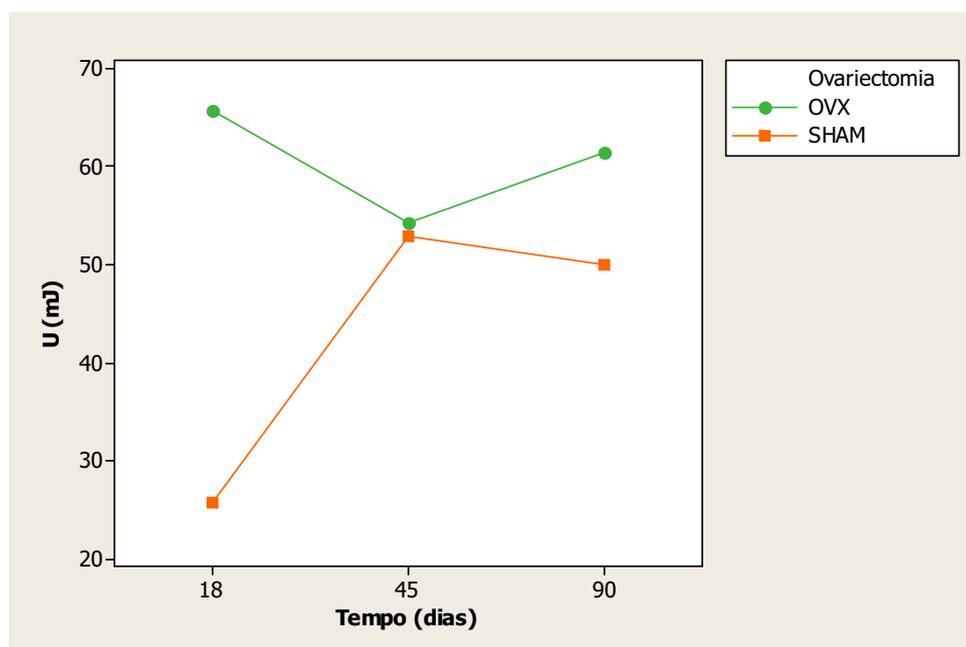


Figura 52 – Gráfico das médias da energia da força máxima dos fêmures O dos grupos SHAM e OVX, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

Na análise comparativa dos grupos OVX e OVX+RIS, para avaliar o relacionamento entre os efeitos dos fatores tratamento e tempo de reparo no fêmur O, foi realizada a análise de variância ANOVA. Nessa análise foi verificada significância na interação entre os fatores tratamento x tempo ($p=0,0003$).

Após realização do teste de comparação múltipla de Tukey para a interação (Tabela 35) verificou-se a formação de dois grupos homogêneos. Houve diferença entre os grupos OVX e OVX+RIS aos 18 e 45 dias. As médias do grupo OVX não variaram de forma estatisticamente significativa com o decorrer do tempo enquanto que as médias de OVX+RIS tiveram os menores valores aos 18 e 45 dias e foram crescentes até noventa dias (Figura 53), quando se igualou estatisticamente ao grupo OVX.

Tabela 35 – Representação das médias de energia da força máxima (U [mJ]) dos grupos OVX e OVX+RIS, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para a interação tratamento x tempo de reparo

Tratamento	Tempo de Reparo (dias)	Média U	Grupos Homogêneos
OVX	18	65,71	A
OVX+RIS	18	17,14	B
OVX	45	54,29	A
OVX+RIS	45	31,43	B
OVX	90	61,43	A
OVX+RIS	90	52,49	A

Letras iguais não diferem de forma estatisticamente significativa

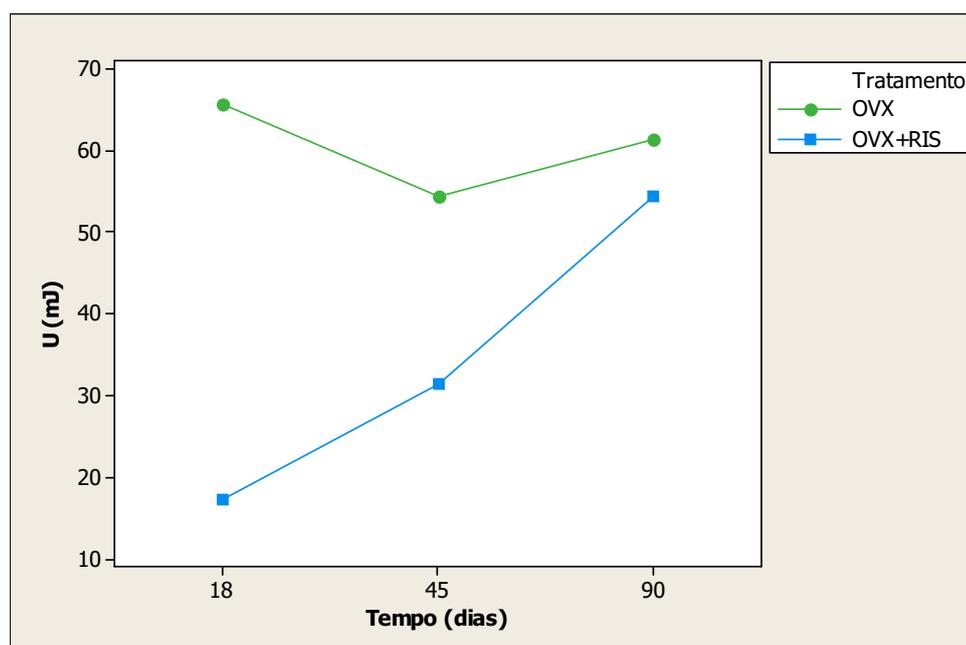


Figura 53 – Gráfico das médias da energia da força máxima dos fêmures O dos grupos OVX e OVX+RIS, aos 18, 45 e noventa dias de reparação.

5.9 Análise morfológica

5.9.1 Período de 18 dias

Aos 18 dias, foram observados basicamente dois padrões diferentes de reparação, um apresentado pelo grupo OVX+RIS e o outro pelos grupos SHAM e OVX.

Os grupos SHAM e OVX apresentaram preenchimento parcial do canal medular e do defeito ósseo com trabéculas formadas a partir da borda do defeito e da superfície endosteal (Figura 54) acompanhadas de alguma aposição periostal principalmente próximo às bordas do defeito. Essas trabéculas eram repletas de lacunas de osteócitos (Figura 57), sendo mais delgadas no grupo OVX e apresentavam mineralização heterogênea, representada pelas diferenças dos tons de cinza encontrados nas amostras.

O grupo OVX+RIS apresentou intensa formação óssea trabecular com preenchimento completo do canal medular e defeito ósseo, além de formação periostal. As trabéculas nesse grupo se apresentaram também repletas de lacunas de osteócitos, mas menos delgadas que nos grupos SHAM e OVX.

5.9.2 Período de 45 dias

Também aos 45 dias foram observados dois padrões de reparação, diferenciando o grupo OVX+RIS dos outros dois. Enquanto o grupo OVX+RIS apresentava persistência do preenchimento do canal medular com trabéculas de aspecto semelhante ao encontrado aos 18

dias, os demais grupos já apresentavam liberação do canal e formação de ponte óssea bem estruturada (Figura 55), de espessura quase semelhante à da cortical e com osso mais maduro, tendendo para compacto e com mineralização heterogênea (Figura 57). Havia um início de formação de ponte óssea no grupo OVX+RIS.

5.9.3 Período de 90 dias

Em todos os grupos houve pouca variação do aspecto morfológico entre 45 e noventa dias. Houve, nos grupos SHAM e OVX, aumento da espessura da ponte óssea e, no grupo OVX+RIS, uma formação mais nítida de ponte óssea compacta, mas com persistência de osso preenchendo o canal medular, mas com maiores sinais de remodelação que aos 45 dias (Figura 56).

Ainda era possível localizar os limites do osso neoformado e do osso preexistente, mesmo aos noventa dias, em todos os grupos.

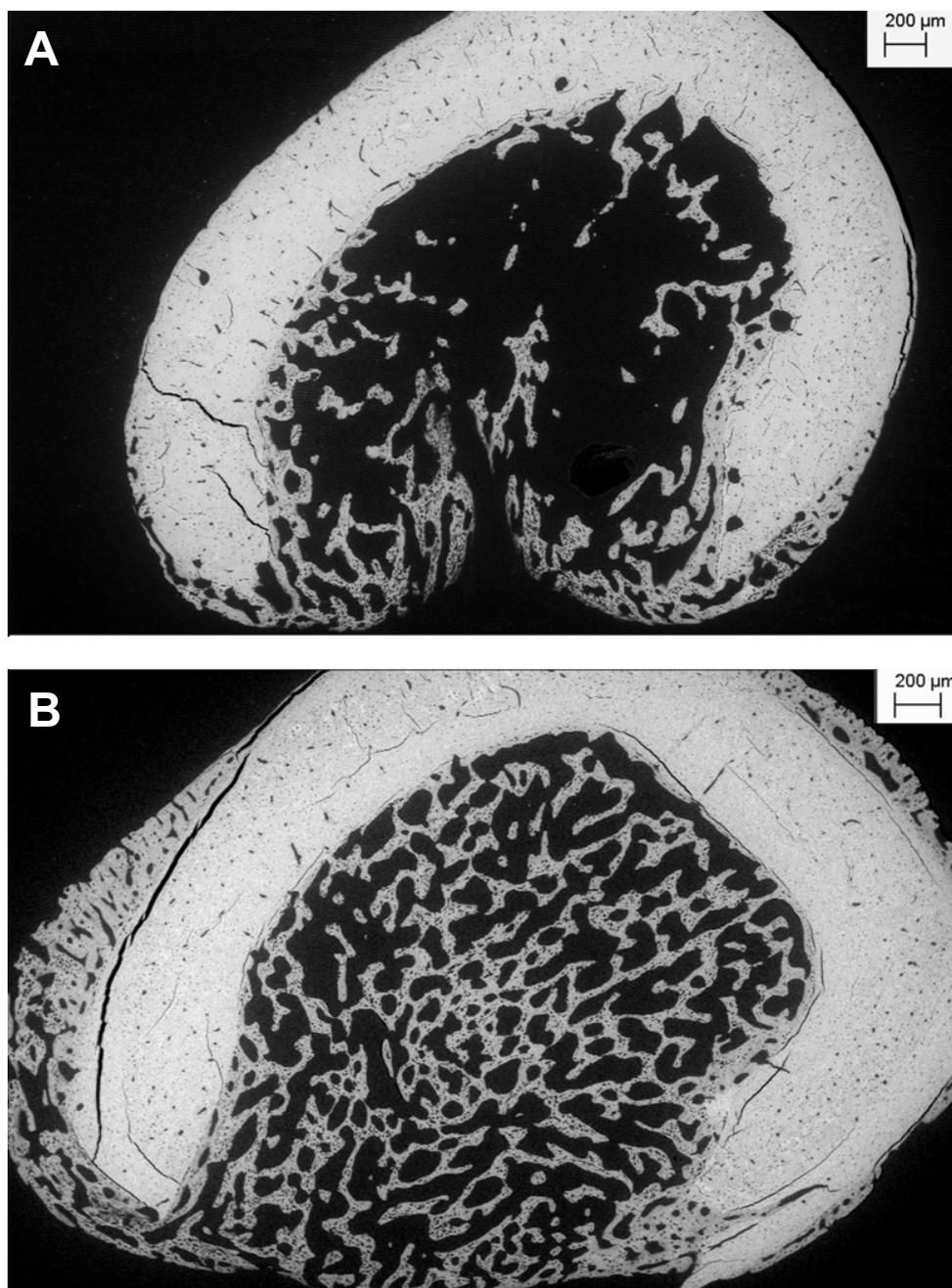


Figura 54 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE aos 18 dias. A) Grupo OVX. Preenchimento parcial do canal medular e do defeito ósseo com com trabéculas delgadas. B) Grupo OVX+RIS. Intensa formação óssea trabecular com preenchimento completo do canal medular e defeito ósseo além de formação periostal.

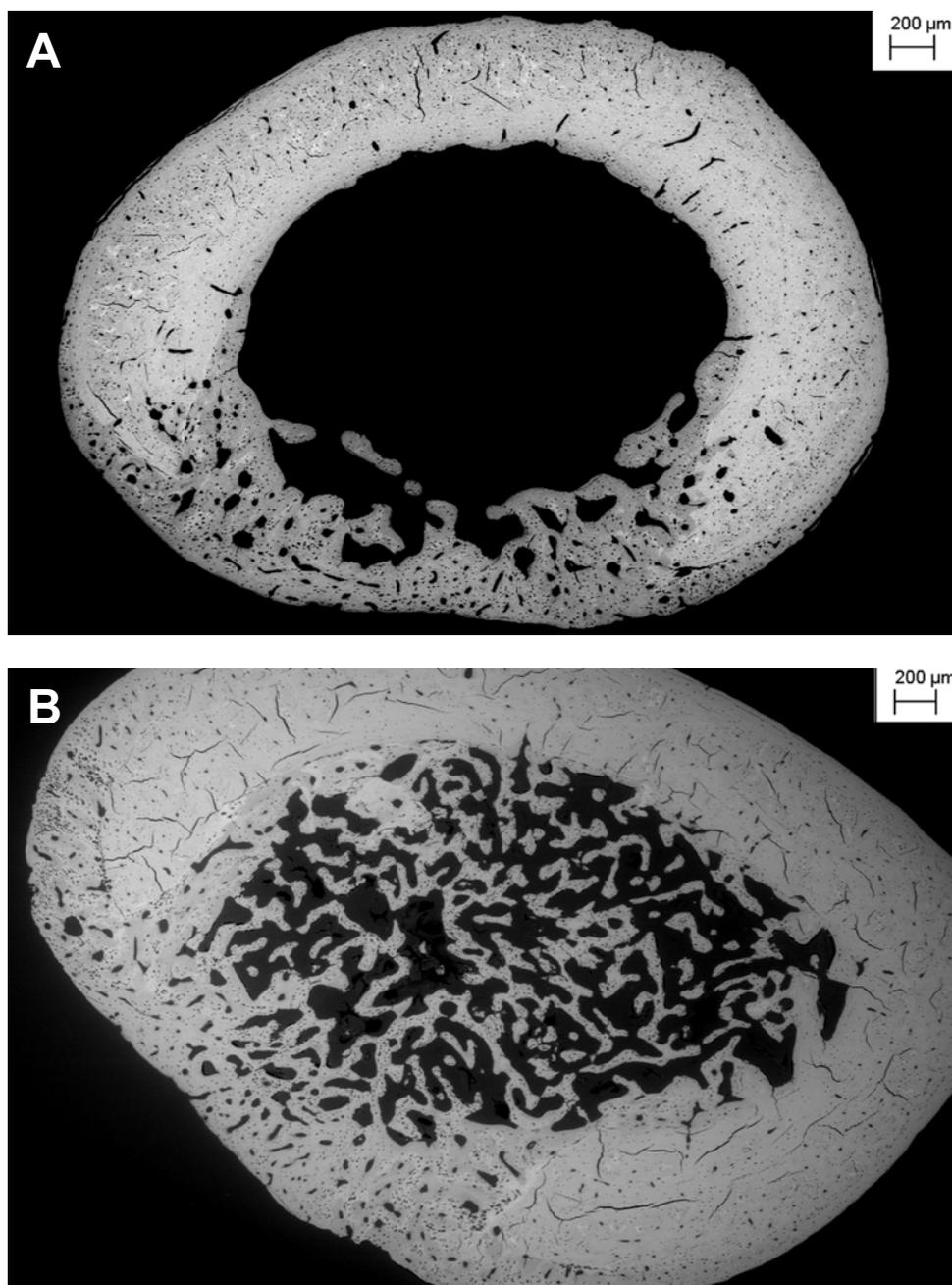


Figura 55 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE aos 45 dias. A) Grupo OVX. Ponte de osso ainda jovem formada unindo as extremidades do defeito. B) Grupo OVX+RIS. Ponte óssea em remodelação unindo as extremidades do defeito e permanência do preenchimento do canal medular com osso trabecular, além de formação periosteal.

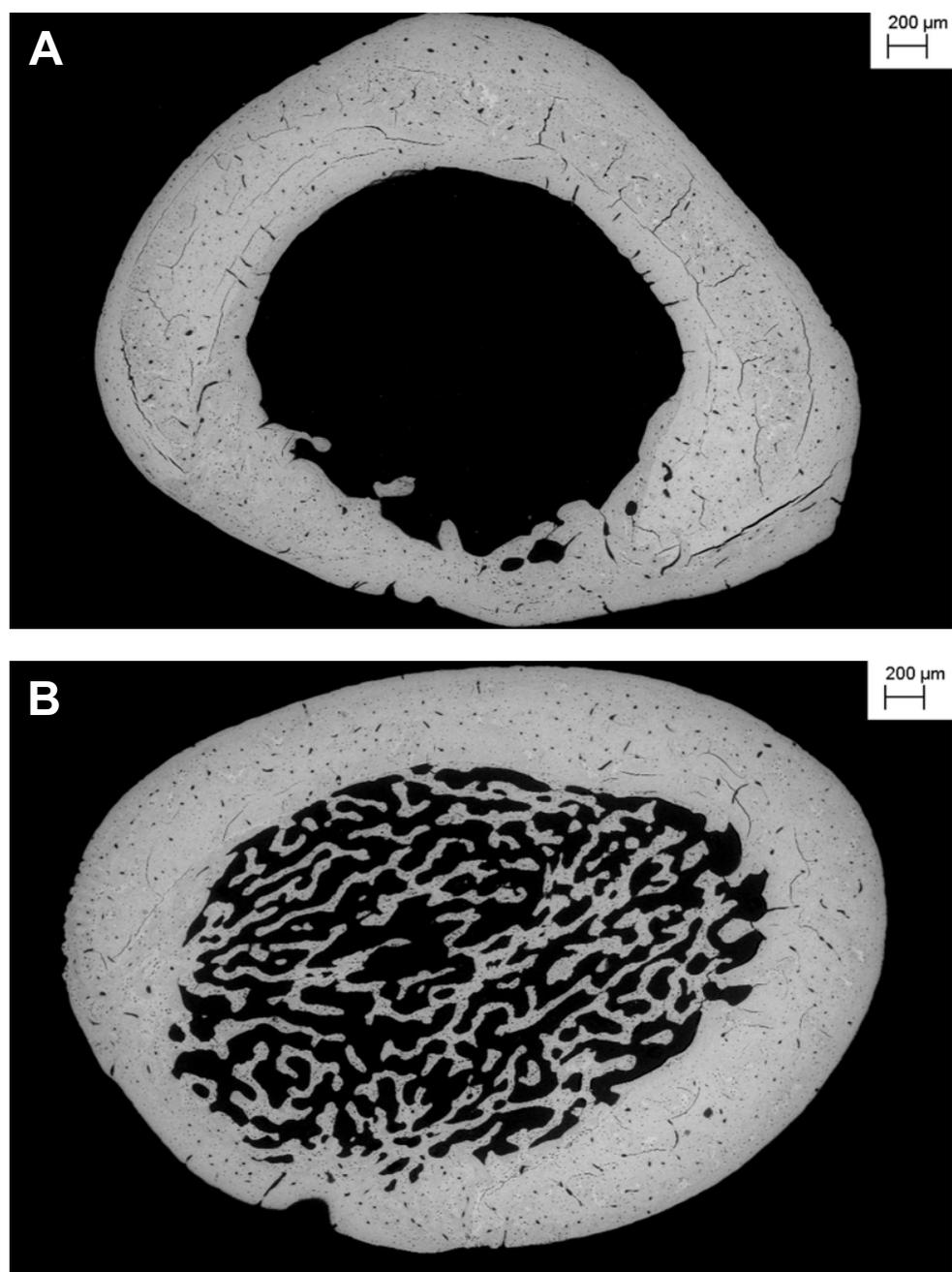


Figura 56 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE aos 90 dias. A) Grupo OVX. Ponte óssea compacta unindo as extremidades do defeito. B) Grupo OVX+RIS. Ponte óssea compacta unindo as extremidades do defeito permanência do preenchimento do canal medular com trabéculas ósseas em remodelação.

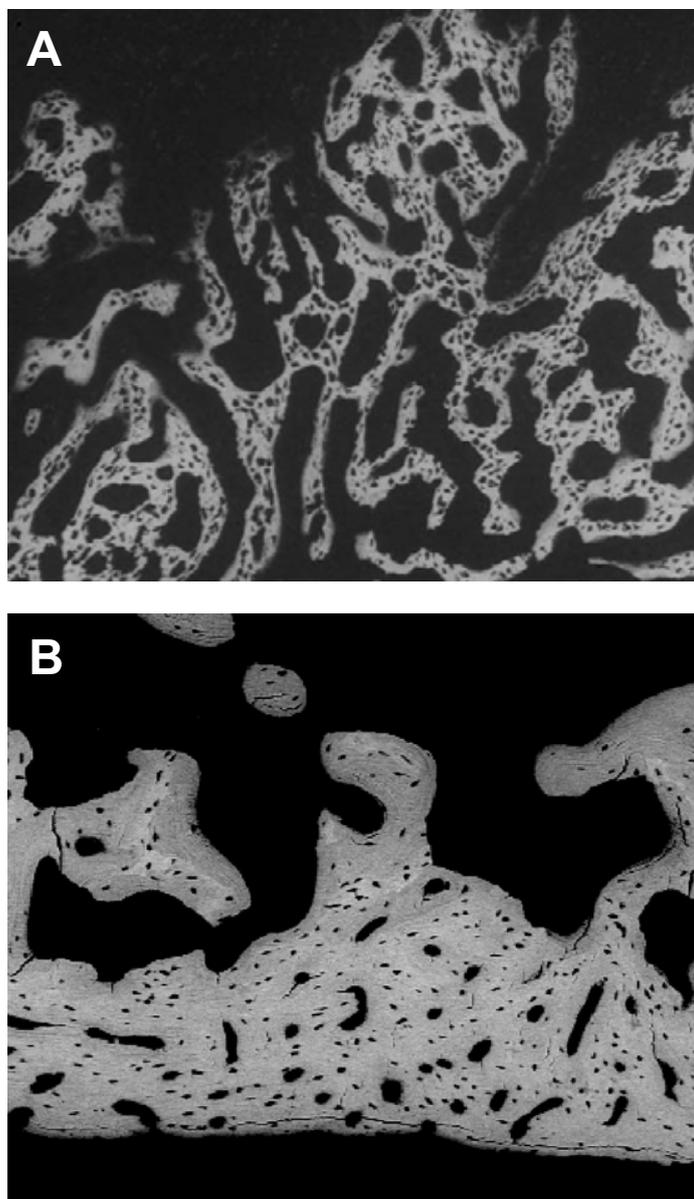


Figura 57 – Análise da reparação óssea por MEV/BSE. A). Osso jovem com trabéculas delgadas e numerosas lacunas. Grupo SHAM, 18 dias. B) Ponte óssea apresentando menos lacunas e mineralização heterogênea (diferentes tons de cinza). Grupo OVX, 45 dias.

6 DISCUSSÃO

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

Neste estudo optou-se pela realização da ovariectomia em ratas jovens (três meses de idade) e aguardou-se 35 dias para que os seus efeitos na perda óssea fossem estabelecidos antes da realização dos defeitos. Esta escolha foi suportada por informações obtidas na literatura e por estudos anteriores realizados nesta universidade. Diversos estudos sobre reparação e qualidade ósseas têm utilizado ratas ovariectomizadas aos três meses de idade (Peng et al., 1997; Walsh et al., 1997, Cao et al., 2002; Amadei, 2004; Silveira, 2004; Tivesten et al., 2004). Kalu (1991) enfatiza que ratos jovens, com aproximadamente três meses de idade manifestam os efeitos da ovariectomia em um mês ou menos, com perda óssea com características próximas da encontrada no rato senil. Wronski et al. (1989) e Thompson et al. (1995) indicam que ratos em crescimento respondem com uma perda óssea mais rápida e em

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

Em todos os grupos de ratas e em todos os períodos de estudo utilizados nesta pesquisa houve ganho de peso corpóreo. Esse incremento no peso foi maior nos animais ovariectomizados, sendo menor no grupo OVX+RIS que no OVX, possivelmente por possíveis alterações gastrintestinais causadas pelo risedronato. A diferença entre o ganho de peso de animais OVX e SHAM está de acordo com os achados de Peng et al. (1997).

É muito difícil fazer uma análise abrangente da qualidade óssea pois muitos são os fatores que contribuem para a resistência óssea e além disso, estes fatores atuam em vários níveis dentro do osso, desde a ultraestrutura óssea até o nível macroscópico. As análises realizadas neste estudo tiveram sua escolha norteadas por questionamentos surgidos em estudo anterior (Senra, 2006) e por indícios da atuação do risedronato afetando a remodelação, a morfologia do calo ósseo e sua mineralização.

Muitos artigos derivam valores de módulo de elasticidade de testes de endentação como a microdureza por nanoendentalção (Rho et al., 1997; Rho; Pharr, 1999; Zysset et al., 1999; Hoffler et al., 2000; Hoc et al., 2006) e por microendentalção (Zioupos et al., 2000; Coats et al., 2003; Rapoff et al., 2008). Estudos recentes (Boivin et al., 2008; Rapoff et al., 2008) defendem que a microendentalção é mais apropriada para materiais heterogêneos como o osso que as técnicas mais convencionais que usam maiores (ultrassom) ou menores espécimes (nanoendentalção). Parece ser seguro derivar o valor de uma propriedade material como o módulo de elasticidade (ou rigidez do material) do valor da microdureza, pois, segundo Hoc et al. (2006), a dureza de um material está correlacionada com seu módulo de elasticidade e, especificamente, a

dureza e o módulo aumentam juntos de maneira consistente.

Uma consideração a ser feita sobre a metodologia utilizada no teste de microdureza é em relação à carga escolhida para a aplicação desse teste. Alguns dos fatores que governam a seleção da carga são o tamanho da região de interesse e o tamanho da impressão gerada, já que uma das vantagens da microendentação é a habilidade de avaliar pequenas regiões (Johnson; Rapoff, 2007). A carga de 25 gf escolhida neste estudo está de acordo com vários autores (Bonser, 1995; Phelps et al., 2000; Dall'Ara et al., 2007; Boivin et al., 2008) e foi selecionada depois da realização de um piloto que verificou qual das cargas testadas, 25 gf ou 50 gf, permitia a análise de regiões tão delgadas quanto as trabéculas encontradas no calo ósseo de 18 dias de reparo, mantendo distância segura das bordas dessas trabéculas e gerando uma impressão com dimensões que permitiam uma medida segura das diagonais, minimizando os erros de medida.

A infiltração e inclusão do osso em resina de metilmetacrilato aumenta a microdureza em 30-40% (Dall'Ara et al., 2007; Johnson; Rapoff; 2007) mas é utilizada na literatura (Bonser, 1995; Giavaresi et al., 2003) e permite a análise de superfícies menores e foi a técnica escolhida para que as análises de microdureza e concentração do Ca e P no mineral ósseo pudessem ser realizados nas mesmas amostras. Boivin et al. (2008) usaram seções de tecido ósseo incluído em resina de metilmetacrilato com cerca de 100 μm , espessura ainda menor que a utilizada no presente estudo, que variou de 150 a 200 μm .

Hoc et al. (2006) ressaltam o papel e a importância da qualidade do tecido ósseo, assim como a influência da heterogeneidade da sua microestrutura no comportamento mecânico. Huja et al. (2006), usando nanoendentação, encontrou menor dureza e módulo de elasticidade em ósteons jovens do que em ósteons velhos. Assim, este estudo esperou encontrar também, só que em nível microestrutural, diferenças na dureza do osso recém-formado no calo e aquele presente

após remodelação do calo.

Tanto a microdureza, quanto o módulo de elasticidade do calo ósseo mostraram comportamento semelhante. Os noventa dias de reparação não foram suficientes para levar o calo ósseo a apresentar valores semelhantes ao do osso preexistente, adjacente ao defeito criado, em nenhum dos grupos (SHAM, OVX e OVX+RIS), mas houve crescimento significativo dos valores ($p=0,0000$) com o aumento do tempo de reparo, principalmente dos 18 aos 45 dias, quando houve, paralelamente, na análise morfológica, uma substituição de osso trabecular por osso cortical no centro do defeito, local onde foram realizadas as endentações, mesmo no grupo OVX+RIS que ainda apresentava trabéculas jovens, mas não no local analisado. De fato, Hodgkinson et al. (1989) afirmaram que o osso cortical é mais duro que o osso trabecular principalmente por variação na mineralização desses tipos ósseos.

A ovariectomia não interferiu nos valores de microdureza e módulo de elasticidade do calo ósseo, mas o tratamento com risedronato elevou os valores de microdureza ($p=0,0254$) e módulo de elasticidade ($p=0,0310$) do calo ósseo, ultrapassando valores encontrados no grupo OVX. O resultado da ovariectomia, em ratas, parece ser diferente do que acontece com pacientes osteoporóticos, conforme estudo de Boivin et al. (2008), que apresentaram redução em 10% da microdureza quando comparados a pacientes normais.

A microdureza foi altamente correlacionada linearmente com a concentração de Ca e de P ($p=0,000$, $r^2=75,5\%$ e $r^2=75,7\%$, respectivamente) indicando que a variação na microdureza é principalmente relacionada com o conteúdo mineral. A contribuição de outros parâmetros tem que ser observada e a variação de cerca de 25% observada talvez possa ser explicada por diferenças na organização e orientação das fibras do colágeno, hipótese levantada por Hoc et al. (2006). De fato, Gupta et al. (2005) encontraram que a deformação

ocorrida na nanoindentação está relacionada a uma deformação fibrilar e alterações na matriz interfibrilar. Estudo de Boivin et al. (2008) relata que embora haja forte correlação de microdureza com o grau de mineralização esta relação não é exclusiva. A matriz orgânica, no osso humano, está relacionada com um terço da sua variação e enfatiza o papel do colágeno na qualidade óssea.

O relacionamento entre a microdureza e a mineralização foi ainda mais forte no grupo SHAM ($r^2=82,7\%$, para a concentração de Ca e, $r^2=85,1\%$, para a concentração de P). Talvez, nos grupos ovariectomizados, haja alguma interferência da ovariectomia na matriz orgânica que afete com mais força a microdureza no reparo desses animais do que nos animais SHAM.

A literatura relata os efeitos da ovariectomia nas fases iniciais da reparação óssea causando atraso na formação do calo e na diferenciação de células ósseas que participam do processo, apresentando persistência de tecido conjuntivo em animais OVX em períodos de reparação nos quais animais *sham* já apresentam formação óssea. (Walsh et al., 1997; Namkung-Matthai et al., 2001; Amadei, 2004; Silveira, 2004; Egermann, 2005; Senra, 2006). Isto parece ser verdade também em relação à mineralização inicial do calo ósseo já que foi encontrada superioridade estatisticamente significativa dos valores de concentração de Ca e de P do grupo SHAM em relação ao grupo OVX aos 18 dias de reparo.

A ovariectomia não afetou a relação Ca/P, embora Tzaphlidou et al. (2005a) relatem que a relação Ca/P pode trazer grande confiabilidade ao diagnóstico de desordens ósseas. Reddy Nagareddy e Lakshmana (2005) encontraram, no osso intacto, valores menores de Ca/P em ratas OVX e com dieta deficiente em cálcio do que em ratas SHAM, resultante de redução do Ca e aumento do P, mas não discutiu o valor deste achado. Outras publicações (Tzaphlidou; Zaichick, 2003; Tzaphlidou et al., 2005b) trazem o relato de variação da relação Ca/P em

ossos intactos por influência da matriz orgânica (presença de lipídios e da medula óssea) afetando a relação Ca/P de diferentes ossos, principalmente na presença de medula vermelha, que eleva muito a concentração de P.

Também na análise do efeito do tratamento é difícil fazer uma comparação direta com a literatura pois estas publicações não tratam de reparação óssea, mas existem muitos relatos na literatura (Meunier; Boivin, 1997; Boivin; Meunier, 2002a; Boivin; Meunier, 2003; Follet et al., 2004; Borah et al., 2005; Roschger et al., 2008) da capacidade dos BFs em aumentar o grau de mineralização óssea através do prolongamento da mineralização secundária obtido com a diminuição da frequência de ativação de novas BSUs. A mineralização primária representaria cerca de 75% da mineralização completa (Meunier; Boivin, 1997).

O bifosfonato risedronato, nas condições estudadas, não influenciou a mineralização do calo ósseo. Neste estudo o tratamento não foi significativo na análise da concentração do Ca, do P e nem na relação Ca/P ($p=0,1664$, $p=0,6762$ e $p=0,0943$, respectivamente). Somente o tempo influenciou na mineralização do calo na comparação de OVX e OVX+RIS.

Em todos os grupos estudados houve crescimento da relação Ca/P com o aumento do tempo de reparação. O estudo de Martinelli et al. (2006) sobre reparo de osso maxilar suíno encontrou aumento da relação Ca/P com o aumento do tempo de reparo, atingindo, valores superiores ao encontrado no controle (não-operado). Estes autores reportaram grande quantidade de carbonato durante a fase de calo celular/fibroso e, conforme aumentava o conteúdo de mineral, reduzia a incorporação de carbonato, fato que os autores desse e de outros estudos (Petrovich et al., 2003; Ouyang et al., 2004) associaram à maturação das fibras colágenas. Para Posner (1969) a hidroxiapatita depositada na presença de carbonato tende a ser pobremente cristalina.

Embora este estudo não tenha usado ferramentas que

permitam esta inferência, esta evolução da relação Ca/P pode estar relacionada à cristalinidade do mineral ósseo. Após um início de calcificação quando o mineral ósseo é depositado em estado amorfo, não cristalino, parte desse mineral amorfo é estabilizada enquanto outra parte sofre dissolução e é transformada em uma fase cristalina (apatita) (Posner, 1969). Subseqüentemente, há o aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita com a maturação dos mesmos (Boivin; Meunier, 2002b; Kuhn et al., 2008).

Em relação à comparação realizada dentro e fora do calo ósseo, em quase todas as condições experimentais as concentrações de Ca e de P do calo ósseo atingiram valores sem diferenças estatísticas aos encontrados no osso preexistente, adjacente ao defeito ósseo, aos noventa dias. Somente o grupo OVX atingiu essa condição de igualdade antes, aos 45 dias, na concentração de Ca.

O valor de Ca/P no osso cortical de fêmures de ratas é $2,12 \pm 0,08$, muito próximo do valor da hidroxiapatita estequiométrica que é 2,16 (Tzaphlidou et al., 2006). Neste estudo encontramos no osso cortical, adjacente ao calo ósseo, valores inferiores (SHAM= $1,8900 \pm 0,008$, OVX= $1,8930 \pm 0,008$ e OVX+RIS= $1,9240 \pm 0,010$) ao deste relato.

Os valores da relação Ca/P dos grupos OVX e OVX+RIS dentro do calo ósseo ultrapassaram aqueles encontrados fora do mesmo aos 45 e noventa dias de reparação, sendo significativa essa diferença.

A compreensão da importância do uso da relação Ca/P como ferramenta de conhecimento e indicador da resistência óssea foi um objetivo deste trabalho, mas não foi alcançado plenamente. Certamente a relação entre as fases orgânica e mineral do osso é mais complexa do que se explica por conclusões independentes e aditivas da função dessas fases na resistência óssea. Entender a função mecânica do osso, como um material, em relação à sua estrutura é um problema fascinante e muito complicado de se resolver (Ziv et al., 1996).

Somente graus elevados de mineralização e microdureza

óssea não podem ser interpretados como indicadores de melhor qualidade óssea. Aumento da mineralização e microdureza como resultado da redução da remodelação óssea podem reduzir a tenacidade ou o trabalho até a fratura, representado pela energia da força máxima, e aumentar a fragilidade óssea (Ng et al., 2004). Por isso foram importantes tanto as observações morfológicas realizadas no calo ósseo, quanto a aplicação do ensaio de flexão, para verificar o reflexo destes parâmetros na resistência óssea à fratura.

Currey et al. (1996) encontraram redução do trabalho até a fratura com o aumento do conteúdo mineral e justificam que isto pode indicar que a relação entre tenacidade e conteúdo mineral pode ser verdadeira somente para uma janela estreita de conteúdo mineral.

É importante relatar que a análise das propriedades mecânicas, apesar de ser amplamente utilizada na literatura, produziu grande variabilidade biológica dentro do grupo e achados, muitas vezes, inconsistentes, se refletindo numa dificuldade em obter resultados de grande confiabilidade de algumas propriedades ósseas provenientes desta análise. O alto coeficiente de variação intragrupo pode ser explicado pela variabilidade anatômica entre os fêmures. Diâmetro externo, área do corte transversal na região da aplicação da força, espessura do calo ósseo e força da união entre ponte óssea e cortical preexistente podem ser alguns dos fatores que podem ter influenciado os resultados. Esse parece ser um problema inerente à aplicação destes ensaios em osso, já que outros autores também encontraram números altos de desvio-padrão em seus estudos (Meyer Jr et al., 2001; Follak et al., 2004)

A rigidez macroscópica obtida nos ensaios mecânicos apresentou os maiores coeficientes de variação intragrupo pode, segundo Hengsberger et al. (2005), ser dominada mais por mudanças na geometria óssea que nas variações das propriedades intrínsecas do osso. De fato, os dados de rigidez analisados não apresentaram significância

nem para as interações, nem para os fatores principais ovariectomia e tratamento. Somente o fator tempo foi significativo nas duas comparações.

O conhecimento da variabilidade de espessura do calo ósseo já havia norteado a decisão de não realizar a normalização da curva carga x deslocamento para obter valores de propriedades intrínsecas (materiais) do osso a partir do ensaio mecânico.

O objetivo da realização do ensaio mecânico na presença de defeito ósseo em reparação, foi o de verificar se potenciais modificações na qualidade óssea do calo influenciaram a função estrutural do calo ósseo através da comparação da resistência à flexão entre fêmures O e NO.

Diferentemente da rigidez, os resultados da força máxima, que representam os valores da resistência óssea à fratura, e os valores da energia da força máxima, que representam o trabalho até a fratura, ou tenacidade, do osso, que apresentaram resultados consistentes e com menores coeficientes de variação intragrupo, responderam bem à proposição. Nenhum grupo estudado, em nenhum tempo de reparo analisado apresentou resistência à fratura estatisticamente igual entre fêmures O e NO, havendo valores de p fortemente significantes, e valores dos fêmures NO muitas vezes maiores do que o dobro do que os encontrados em fêmures O. Este achado, associado aos achados morfológicos, demonstram que, mesmo no maior período estudado, noventa dias, ainda não houve a regeneração completa do osso da lesão com o restabelecimento das características histológicas e mecânicas normais do osso e que a influência desse processo de reparação favoreceu a absorção de menos energia e a fratura dos fêmures O.

Na análise da influência da ovariectomia e do tratamento nos fêmures O foi significativa a interação entre estes fatores e o tempo de reparo, tanto para a força máxima como para a energia da força máxima.

A comparação entre SHAM e OVX mostrou pouca

diferença entre as condições estudadas, havendo inferioridade estatística do grupo SHAM somente aos 18, na força máxima e na energia da força máxima. Essa semelhança das condições experimentais poderia ser interpretada de duas maneiras: ou a presença do reparo fragiliza o fêmur de maneira muito intensa, sendo necessário muito mais tempo de reparo que o utilizado neste estudo para o restabelecimento funcional do osso, ou os parâmetros experimentais utilizados no ensaio de flexão, mascararam tênues diferenças existentes no reparo desses ossos. Muito cuidado foi tomado em relação à escolha da célula de carga, que foi compatível com os valores de força máxima registrados. A velocidade de aplicação da carga foi bastante pequena e distância entre os apoios foi escolhida para manter a peça estável durante o teste e para que o ensaio fosse aplicado na região anatômica do fêmur com área de seção transversal cilíndrica, evitando-se maiores interferências da forma do osso, já que não se podiam evitar variações nas dimensões desses fêmures.

Embora o teste de flexão seja francamente utilizado na análise das propriedades mecânicas do osso, não existe uma padronização dos procedimentos nos ensaios (Schriefer et al., 2005) e muito variados são os parâmetros de aplicação do teste para um mesmo osso. Outros autores (Li et al., 2001; Meyer Jr et al., 2001; Cao et al., 2002; Follak et al., 2004) também verificaram as propriedades biomecânicas de fêmures em reparação e seus resultados não podem ser diretamente comparados devido à utilização de condições experimentais muito diversas, como o uso de fraturas completas, tempos de reparo diferentes e parâmetros de aplicação do ensaio diferentes.

Quando comparado ao grupo OVX, o grupo OVX+RIS apresentou resultados inferiores de força máxima aos 18 dias de reparo e, de energia da força máxima, aos 18 e 45 dias. Isso demonstra uma influência negativa do medicamento nas propriedades mecânicas iniciais do osso em reparação, apesar do grande volume de osso presente no

defeito e no canal medular. Mesmo assim, a comparação entre esses grupos aos noventa dias, que apresentaram na análise morfológica padrões de reparação tão diferentes entre si, mostrou resposta semelhante nas propriedades mecânicas, mostrando competência funcional do osso nesse período, apesar do atraso da remodelação provocado pelo risedronato, e da ponte óssea não estar ainda bem formada.

Os resultados da resistência e da tenacidade óssea dos fêmures O foram bastante parecidos, embora geralmente apareçam como inversamente relacionados (Currey, 2001) já que a maior mineralização de um material leva à redução da capacidade deste material absorver energia e a uma maior fragilidade. Talvez pelo fato dos ensaios terem sido realizados em ossos com um defeito em reparação, a presença das trabéculas ósseas, a microarquitetura do calo e a heterogeneidade da mineralização do mesmo tenham proporcionado maior capacidade deste osso se rearranjar para absorver a força aplicada durante o ensaio. É difícil saber se houve uma maior influência material ou estrutural.

Segundo Hernandez e Keaveny (2006), qualidade óssea é um termo vago que se refere aos efeitos de fatores esqueléticos que contribuem para a resistência óssea. Por isso, não haveria sentido fazer um estudo de qualidade óssea com a análise de várias características do tecido e da arquitetura óssea sem chegar na análise da *performance* desse osso como um todo. Nesse sentido, a análise das propriedades mecânicas desses ossos, mesmo com a apresentação das reservas colocadas sobre esse tipo de análise óssea, foi de extrema importância nesse estudo. O ensaio realizado permitiu verificar qual a importância clínica dos fatores analisados à luz do conhecimento de que alterações ósseas ocorridas em escala física de análise menor, como a mineralização, podem ser compensados estruturalmente por fatores analisados em outro nível como, por exemplo, a arquitetura e o volume ósseos. Se alterações detectadas em nível microestrutural não

influenciam a qualidade óssea em um nível superior, essas alterações podem não ser relevantes clinicamente.

Assim, foi observado neste estudo, que as alterações mais importantes ocorridas no calo ósseo estavam mais relacionadas ao tempo de reparação que à ovariectomia e ao tratamento com risedronato. Essas diferenças afetaram mais os períodos iniciais de reparação, tendendo a haver proximidade das condições nos períodos mais longos de estudo.

Também as diferenças morfológicas tiveram pouca influência na resposta funcional e estrutural. O somatório dos fatores analisados levou a um comportamento biomecânico muito parecido entre os grupos e diferentes períodos de reparação.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados, sob as condições experimentais utilizadas, possibilitou concluir que a deficiência de estrógeno interferiu na mineralização inicial do calo ósseo, mas estas alterações não influenciaram a resistência óssea à fratura, enquanto que o risedronato atrasou a remodelação do calo ósseo e levou à formação de um calo com maior dureza que se refletiu numa performance biomecânica nos tempos iniciais estudados mas se recuperou aos noventa dias de reparação. Tanto a deficiência de estrógeno quanto o tratamento com risedronato levaram a modificações da qualidade óssea iniciais do calo que foram neutralizadas e equiparadas aos noventa dias, mesmo antes da regeneração completa do osso.

Essas conclusões foram possíveis quando baseadas na resposta aos objetivos específicos que foram:

- a) a ovariectomia não afetou os valores de microdureza e de módulo de elasticidade no calo ósseo;
- b) a ovariectomia diminuiu os valores de concentração de Ca e P somente no início da reparação óssea, aos 18 dias, sem afetar a relação Ca/P;
- c) o tratamento com risedronato aumentou os valores de microdureza e de módulo de elasticidade;
- d) o tratamento com risedronato não afetou os valores da concentração de Ca de P e da relação Ca/P no calo ósseo;

- e) o tratamento com risedronato atrasou a remodelação do calo ósseo;
- f) o período de noventa dias de reparação não foi suficiente para igualar os valores de microdureza e de módulo de elasticidade dentro e fora do calo ósseo;
- g) o período de noventa dias de reparação foi suficiente para igualar a concentração de Ca e de P dentro e fora do calo ósseo;
- h) o período de noventa dias de reparação levou a uma maior relação Ca/P dentro do que fora do calo ósseo nos animais ovariectomizados;
- i) a microdureza é fortemente relacionada com a concentração de Ca e de P, mas não com a relação Ca/P;
- j) a ovariectomia e o tempo de reparo tiveram pouca influência nas propriedades biomecânicas dos fêmures O;
- k) o tratamento com risedronato levou a propriedades mecânicas inferiores aos 18 e 45 dias nos fêmures O, mas se igualou aos fêmures sem tratamento aos noventa dias;
- l) o período de noventa dias de reparação não foi suficiente para restabelecer as propriedades biomecânicas dos fêmures O.

8 REFERÊNCIAS*

Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*. 2004 Mar;34(3):443-53.

Allen MR, Iwata K, Phipps R, Burr DB. Alterations in canine vertebral bone turnover, microdamage accumulation, and biomechanical properties following 1-year treatment with clinical treatment doses of risedronate or alendronate. *Bone*. 2006 Oct;39(4):872-9.

Alvisi M, Blome M, Griepentrog M, Hodoroaba VD, Karduck P, Mostert M et al. The determination of the efficiency of energy dispersive X-ray spectrometers by a new reference material. *Microsc Microanal*. 2006 Oct;12(5):406-15.

Amadei SU. Estudo comparativo dos efeitos da isoflavona e da ipriflavona na reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.

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 Sept;23(5):1029-34.

Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S13-8.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barger-Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in osteoporosis: transiliac biopsy and histomorphometry. *Top Magn Reson Imaging*. 2002;13(5):297-306.

Bateman TA, Zimmerman RJ, Ayers RA, Ferguson VL, Chapes SK, Simske SJ. Histomorphometric, physical, and mechanical effects of spaceflight and insulin-like growth factor-I on rat long bones. *Bone*. 1998 Dec;23(6):527-35.

Bauss F, Dempster DW. Effects of ibandronate on bone quality: preclinical studies. *Bone*. 2007;40:265-73.

Bell KL, Loveridge N, Jordan GR, Power J, Constant CR, Reeve J. A novel mechanism for induction of increased cortical porosity in cases of intracapsular hip fracture. *Bone*. 2000 Aug;27(2):297-304.

Benhamou CL. Effects of osteoporosis medications on bone quality. *Joint Bone Spine*. 2007 Jan;74(1):39-47.

Bohic S, Rey C, Legrand A, Sfihl H, Rohanizadeil R, Martel C et al. Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone*. 2000 Apr;26(4):341-8.

Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*. 2008 Sep;43(3):532-8.

Boivin G, Meunier PJ. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002a Dec;2(6):538-43.

Boivin G, Meunier PJ. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif Tissue Int*. 2002b Jun;70(6):503-11.

Boivin G, Meunier PJ. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S19-24.

Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, Yates J, Meunier PJ. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone*. 2000 Nov;27(5):687-94.

Bonser RH. Longitudinal variation in mechanical competence of bone along the avian humerus. *J Exp Biol*. 1995 Jan;198(Pt 1):209-12.

Borah B, Ritman EL, Dufresne TE, Jorgensen SM, Liu S, Sacha J et al. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover. *Bone*. 2005 July;37(1):1-9.

Bourrin S, Ammann O, Bonjour JP, Rizzoli R. Recovery of proximal tibia bone mineral density and strength, but not cancellous bone architecture, after long-term bisphosphonate or selective estrogen receptor modulator therapy in aged rats. *Bone*. 2002 Jan;39(1):195-200.

Brooks JK, Gilson AJ, Sindler AJ, Ashman SG, Schwartz KG, Nikitakis NG. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jun;103(6):780-6.

Broz JJ, Simske SJ, Greenberg AR. Material and compositional properties of selectively demineralized cortical bone. *J Biomech*. 1995 Nov;28(11):1357-68.

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2002 Dec;17(12):2237-46.

Chachra D, Turner CH, Dunipace AJ, Grynblas MD. The effect of fluoride on bone mineral in rabbits. *Calcified Tissue International*. 1999;64:345-51.

Ciarelli TE, Fyhrie DP, Parfitt AM. Effects of vertebral bone fragility and bone formation rate on the mineralization levels of cancellous bone from white females. *Bone*. 2003 Mar;32(3):311-5.

Coats AM, Zioupos P, Aspden RM. Material properties of subchondral bone from patients with osteoporosis or osteoarthritis by microindentation testing and electron probe microanalysis. *Calcif Tissue Int.* 2003 Jul;73(1):66-71.

Currey JD, Brear K, Zioupos P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech.* 1996 Feb;29(2):257-60.

Currey JD. Bone strength: what are we trying to measure? *Calcif Tissue Int.* 2001 Apr;68(4):205-10.

Dai XM, Zong XH, Akhter MP, Stanley ER. Osteoclast deficiency results in disorganized matrix, reduced mineralization, and abnormal osteoblast behavior in developing bone. *J Bone Miner Res.* 2004 Sept.;19(9):1441-51.

Dall'Ara E, Ohman C, Baleani M, Viceconti M. The effect of tissue condition and applied load on Vickers hardness of human trabecular bone. *J Biomech.* 2007;40(14):3267-70.

Eastell R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 1998 Mar 12;338(11):736-46.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2005 Mar;16 Suppl 2:S129-38.

Einhorn TA. Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int.* 1992 Nov;51(5):333-9.

Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther.* 2005 Jan;27(1):1-11.

Fogelman I, Ribot C, Smith R, Ethgen D, Sod E, Reginster JY. Risedronate reverses bone loss in postmenopausal women with low bone mass: results from a multinational, double-blind, placebo-controlled trial. BMD-MN Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):1895-900.

Follak N, Klötting I, Wolf E, Merk H. Improving metabolic control reverses the histomorphometric and biomechanical abnormalities of an experimentally induced bone defect in spontaneously diabetic rats. *Calcif Tissue Int.* 2004 Jun;74(6):551-60.

Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone.* 2004 May;34(5):783-9.

Fratzl P, Roschger P, Fratzl-Zelman N, Paschalis EP, Phipps R, Klaushofer. Evidence that treatment with risedronate in women with postmenopausal osteoporosis affects bone mineralization and bone volume. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:73-80.

Genant HK, Cooper C, Poor G, Reid I, Ehrlich G, Kanis J et al..K. et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1999;10(4):259-64.

Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L et al. Histomorphometric and microhardness assessments of sheep cortical bone surrounding titanium implants with different surface treatments. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Oct 1;67(1):112-20.

Gupta HS, Wagermaier W, Zickler GA, Raz-Ben Aroush D, Funari SS, et al. Nanoscale deformation mechanisms in bone. *Nano Lett.* 2005 Oct;5(10):2108-11.

Haddad A, Sesso A, Attias M, Farina M, Meirelles MN, Silveira M, et al. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.

Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA.* 1999 Oct 13;282(14):1344-52.

Hengsberger S, Ammann P, Legros B, Rizzoli R, Zysset P. Intrinsic bone tissue properties in adult rat vertebrae: modulation by dietary protein. *Bone.* 2005 Jan;36(1):134-41.

Hernandez CJ, Beaupré GS, Keller TS, Carter DR. The influence of bone volume fraction and ash fraction on bone strength and modulus. *Bone*. 2001 Jul;29(1):74-8.

Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. *Bone*. 2006 Dec;39(6):1173-81.

Hirabayashi H, Fujisaki J. Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(15):1319-30.

Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Does suppression of bone turnover impair mechanical properties by allowing microdamage accumulation? *Bone*. 2000 Jul;27(1):13-20.

Hoc T, Henry L, Verdier M, Aubry D, Sedel L, Meunier A. Effect of microstructure on the mechanical properties of Haversian cortical bone. *Bone*. 2006 Apr;38(4):466-74.

Hodgkinson R, Currey JD, Evans GP. Hardness, an indicator of the mechanical competence of cancellous bone. *J Orthop Res*. 1989;7(5):754-8.

Hoffler CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Brown MB, Goldstein SA. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone*. 2000 Jun;26(6):603-9.

Howell PG, Boyde A. Volumes from which calcium and phosphorus X-rays arise in electron probe emission microanalysis of bone: Monte Carlo simulation. *Calcif Tissue Int*. 2003 Jun;72(6):745-9.

Huja SS, Beck FM, Thurman DT. Indentation properties of young and old osteons. *Calcif Tissue Int*. 2006 Jun;78(6):392-7.

Ito M, Nishida A, Aoyagi K, Uetani M, Hayashi K, Kawase M. Effects of risedronate on trabecular microstructure and biomechanical properties in ovariectomized rat tibia. *Osteoporos Int*. 2005 Sept.;16(9):1042-8.

Jee WSS. Animals models in the prevention and treatment of osteopenia: forward. *Bone*. 1995 Oct;17(4):113S-4S.

Johnson WM, Rapoff AJ. Microindentation in bone: hardness variation with five independent variables. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Apr;18(4):591-7.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec;15(3):175-91.

Kazakia GJ, Majumdar S. New imaging technologies in the diagnosis of osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Jun.;7(1-2):67-74.

Kimble RB. Alcohol, cytokines, and estrogen in the control of bone remodeling. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 May;21(3):385-91.

Koivukangas A, Tuukkanen J, Kippo K, Jämsä T, Hannuniemi R, Pasanen I et al. Long-term administration of clodronate does not prevent fracture healing in rats. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Mar;(408):268-78.

Kowalski SC, Szejnfeld VL, Ferraz MB. Utilização de recursos e custos em osteoporose. *Rev Assoc Med Bras*. 2001 out./dez.; 47(4):352-7.

Kuhn LT, Grynblas MD, Christian CR, Wu Y, Ackerman JL, Glimcher J. A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages. *Calcif Tissue Int*. 2008;83(2):146-54.

Lane JM, Riley EH, Wirganowicz PZ. Osteoporosis: diagnosis and treatment. *J Bone Joint Surg*. 1996 Apr;78-A(4):618-32.

Leu CT, Luegmayr E, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone*. 2006 May;38(5):628-36.

Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J, et al. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res*. 2001 Mar.;16(3):429-36.

Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. *J Bone Miner Res.* 1999 Jun.;14(6):969-79.

Liebhafsky HA et al. X-Ray absorption and emission in analytical chemistry. In: Spectrochemical analysis with X-rays. 2.ed., New York: John Wiley e Sons; 1966.

Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* 2004 Apr;25(9):1697-714.

Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* 2004 Feb. 11;23(3):552-63.

Maliska AM. Microscopia eletrônica de varredura [apostila]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Mecânica. Acesso em 11/05/09. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37.

Martinelli FL, Holanda RF, Andrade LR, Tirre-Araujo MS. Alterações histológicas e de conteúdo mineral na área de correção de fenda alveolar por distração osteogênica – *in vivo*. *Revista Odonto Ciência.* 2006 Abr/Jun;21(52):112-7.

Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by biphosphonates increases microdamage accumulation and reducer some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res.* 2000 Apr;15(4):613-20.

Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone.* 2001 May;28(5):524-31.

Meunier PJ, Boivin G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone*. 1997 Nov;21(5):373-7.

Meyer Jr RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res*. 2001 May;19(3):428-35.

Migliorati Ca, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. O tratamento de pacientes com osteonecrose associada aos bifosfonatos: uma tomada de posição da Academia Americana de Medicina Oral. *JADA*. 2006 Maio/Jun;6(3):5-16.

Mittra E, Rubin C, Qin YX. Interrelationship of trabecular mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone. *J Biomech*. 2005 Jun;38(6):1229-37.

Nagashima M, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Tanaka M, Nakamura T. Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone*. 2005 Mar;36(3):502-11.

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006 May;38(5):617-27.

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001 Jan;28(1):80-6.

Netelenbos C. Osteoporosis: intervention options. *Maturitas*. 1998 Nov. 16;30(3):235-9.

Ng AH, Hercz G, Kandel R, Grynpas MD. Association between fluoride, magnesium, aluminum and bone quality in renal osteodystrophy. *Bone*. 2004 Jan;34(1):216-24.

O'Brien FJ, Hardiman DA, Hazenberg JG, Mercy MV, Mohsin S, Taylor D, Lee TC. The behaviour of microcracks in compact bone. *Eur J Morphol.* 2005 Feb-Apr;42(1-2):71-9.

Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1294-301.

Ouyang H, Sherman PJ, Paschalis EP, Boskey AL, Mendelsohn R. Fourier transform infrared microscopic imaging: effects of estrogen and estrogen deficiency on fracture healing in rat femurs. *Appl Spectrosc.* 2004 Jan;58(1):1-9.

Oxlund H, Mosekilde L, Ortoft G. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone.* 1996 Nov;19(5):479-84.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987 Dec;2(6):595-610.

Parfitt AM. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int.* 1984;36 Suppl 1:S123-8.

Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone.* 1997 Mar;20(3):207-12.

Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Dmitriev IM. Study of labeled carbonate metabolism in healthy organisms during reparative osteogenesis and denervation by the bone/plasma index. *Bull Exp Biol Med.* 2003 Aug;136(2):135-8.

Phelps JB, Hubbard GB, Wang X, Agrawal CM. Microstructural heterogeneity and the fracture toughness of bone. *J Biomed Mater Res.* 2000 Sep 15;51(4):735-41.

Posner AS. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev.* 1969 Oct;49(4):760-92.

Radominski SC, Pinto-Neto AM, Marinho RM, Costa-Paiva LHS, Pereira FAZ, Urbanetz AA et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa [monografia]. São Paulo: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia e Sociedade Brasileira de Reumatologia, Projeto Diretrizes; 2002.

Randell A, Sambrook PN, Nguyen TV, Lapsley H, Jones G, Kelly PJ, Eisman JA. Direct clinical and welfare costs of osteoporotic fractures in elderly men and women. *Osteoporos Int.* 1995;5(6):427-32.

Rapoff AJ, Rinaldi RG, Hotzman JL, Daegling DJ. Elastic modulus variation in mandibular bone: a microindentation study of *Macaca fascicularis*. *Am J Phys Anthropol.* 2008 Jan;135(1):100-9.

Reddy Nagareddy P, Lakshmana M. Assessment of experimental osteoporosis using CT-scanning, quantitative X-ray analysis and impact test in calcium deficient ovariectomized rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005 Nov/Dec;52(3):350-5.

Rho JY, Pharr GM. Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation. *J Mater Sci Mater Med.* 1999 Aug;10(8):485-8.

Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials.* 1997 Oct;18(20):1325-30.

Riches PE, Everitt NM, Heggie AR, McNally DS. Microhardness anisotropy of lamellar bone. *J Biomech.* 1997 Oct;30(10):1059-61.

Riches PE, Everitt NM, McNally DS. Knoop microhardness anisotropy of the ovine radius. *J Biomech.* 2000 Dec;33(12):1551-7.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002 June;23(3):279-302.

Risedronate Sodium. Am J Health Syst Pharm. 2001 Sept.;58(18):1706-7.

Rodan GA, Reszka AA. Osteoporosis and biphosphonates. J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A Suppl 3:8-12.

Roschger P, Paschalis EP, Fratzi P, Klaushofer K. Bone mineralization density distribution in health and disease. Bone. 2008 Mar;42(3):456-66.

Rubin MA, Jasiuk I, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian RP. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. Bone. 2003;33:270-82.

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral MaxillofacSurg. 2004 May;62(5):527-34.

Sahar ND, Hong SI, Kohn DH. Micro- and nano-structural analyses of damage in bone. Micron. 2005;36(7-8):617-29.

Schenk RK. Regeneração óssea: bases biológicas. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Quintessence; 1996. Cap.3, p. 49-100.

Schriefer JL, Robling AG, Warden SJ, Fournier AJ, Mason JJ, Turner CH. A comparison of mechanical properties derived from multiple skeletal sites in mice. J Biomech. 2005 Mar;38(3):467-75.

Senra GS. Estudo comparativo de reparação óssea em ratas ovariectomizadas tratadas com risedronato e *Calcareia fluorica* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2006.

Silva Junior JF. Resistência dos materiais. 2nd ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; 1972.

Silva MJ, Gibson LJ. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure. Bone. 1997 Aug;21(2):191-9.

Silva MJ. Biomechanics of osteoporotic fractures. *Injury*. 2007 Sep;38 Suppl 3:S69-76.

Silveira VAS. Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal com estrógeno e da associação de ambos na reparação de defeitos ósseos em ratas ovariectomizadas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2004.

Stepan JJ, Alenfeld F, Boivin G, Feyen JH, Lakatos P. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Regul*. 2003 Dec.;37(4):225-38.

Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(10):863-81.

Suh TT, Lyles KW. Osteoporosis considerations in the frail elderly. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 July;15(4):481-6.

Suvorova EI, Petrenko PP, Buffat PA. Scanning and transmission electron microscopy for evaluation of order/disorder in bone structure. *Scanning*. 2007 Jul-Aug;29(4):162-70.

Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.

Tivesten A, Movérare-Skrtic S, Chagin A, Venken K, Salmon P, Vanderschueren D, et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2004 Nov;19(11):1833-9.

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. 1995 Oct;17(4 Suppl):125S-133S.

Turner AS. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater*. 2001 Jun 22;1:66-81.

Turner CH. Aging and fragility of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Oct-Dec;7(4):342-3.

Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int*. 2002;13(2):97-104.

Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, et al. Animal model for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2:117-27.

Turner RT, Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):276-81.

Tzaphlidou M, Berillis P, Matthopoulos D. Bone calcium, phosphorus detection by Auger electron spectroscopy. *Micron*. 2005a;36(7-8):706-9.

Tzaphlidou M, Speller R, Royle G, Griffiths J, Olivo A, Pani S, Longo R. High resolution Ca/P maps of bone architecture in 3D synchrotron radiation microtomographic images. *Appl Radiat Isot*. 2005b Apr;62(4):569-75.

Tzaphlidou M, Speller R, Royle G, Griffiths J. Preliminary estimates of the calcium/phosphorus ratio at different cortical bone sites using synchrotron microCT. *Phys Med Biol*. 2006 Apr 7;51(7):1849-55.

Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 2006;17(3):319-36.

Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Sep;(342):218-27.

Watts NB, Cooper C, Lindsay R, Eastell R, Manhart MD, Barton IP, et al. Relationship between changes in bone mineral density and vertebral fracture risk associated with risedronate: greater increases in bone mineral density do not relate to greater decreases in fracture risk. *J Clin Densitom*. 2004 Fall;7(3):255-61.

Wilkinson GS, Kuo YF, Freeman JL, Goodwin JS. Intravenous bisphosphonate therapy and inflammatory conditions or surgery of the jaw: a population-based analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Jul 4; 99(13):1016-24.

World Health Organization (WHO). *Drug Information.* 2006;20(3):163-82.

Woo T, Adachi JD. Role of bisphosphonates and calcitonin in the prevention and treatment of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001 July;15(3):469-81.

Wronski Tj, Dann Lm, Scott Ks, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int.* 1989 Dec;45(6):360-6.

Zaichick V, Tzaphlidou M. Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis. *Applied Radiation and Isotopes.* 2003;58:623-7.

Zioupos P, Currey JD, Casinos A. Exploring the effects of hypermineralisation in bone tissue by using an extreme biological example. *Connect Tissue Res.* 2000;41(3):229-48.

Ziv V, Wagner HD, Weiner S. Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone. *Bone.* 1996 May;18(5):417-28.

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

 **UNESP**  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Diniz
CEP 12281-876 - F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9810 - emly@fod.usp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 030/2006-PA/CEP, sobre "Avaliação da qualidade óssea no reparo de defeitos ósseos sob a ação do risedronato e da deficiência estrogênica", sob a responsabilidade de **GISELLE SEGNINI SENRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 21 de dezembro de 2006.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naresi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Senra GS. *Bone quality evaluation on bone defects repaired under effects of risedronate treatment and estrogen deficiency [doctorate thesis]*. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The increase in life expectancy is associated with a higher osteoporosis incidence, which elevates the occurrence of bone fractures, and demand long treatment. In the last years, it's increasing de interest in the potential effects of osteoporosis medication on bone fractures healing. The aim of this work will be to evaluate the effects of Risedronate (10,5 mg/Kg/week) on bone quality in the femoral callus in rats with induced osteopenia. For that, 84 rats were subject to ovariectomy, and 42 were sham operated. After 35 days, 2,5 mm monocortical bone lesions were drilled on all animals femurs. Then, treatment began. The ovariectomized animals, divided in two groups, received Risedronate or drinking water as a placebo. The animals were sacrificed at 18, 45 and ninety days of bone repair. The central sections from bone defects from half of the rats were analyzed to determine their morphology using an SEM, electron probe microanalysis (μ ED-XRF) from bone mineral Ca, P and Ca/P ratio and Vicker's microhardness. Another half of the animals had the left femur operated (O), and the right one, non operated (NO), both frozen till be tested in three-point flexure to derive maximum load, stiffness and energy absorbed to maximum load. Statistical analyses were performed using t-Student, ANOVA, Tukey and Linear Correlation tests, considering 5% significance. Microhardness was strongly correlated to Ca and P concentrations but it was moderately correlated with Ca/P. Ovariectomy didn't affect microhardness (HV) and Young modulus (E) but diminished, at 18 days, Ca/P, Ca and P concentrations. Risedronate treatment achieved increasing in HV and E without interference on Ca/P, Ca and P concentration of bone callus. Ovariectomy and healing time almost didn't have influence on biomechanical properties of O, different from risedronate, which diminished these properties at 18 and 45 days. The HV and E from callus didn't reach outside callus values at ninety days, but Ca and P concentrations were equalized. A full biomechanical property of NO was not achieved by O after ninety days of bone healing.

KEYWORDS: *Diphosphonates. Bone Regeneration. Osteoporosis, Postmenopausal. Rats. Microscopy, Electron, Scanning. Hardness Tests. Spectrometry, X-Ray Emission.*