PAULO EUGÊNIO SANTOS CECIM

**USO DE ALENDRONATO DE SÓDIO EM RATAS SUBMETIDAS À
IMOBILIZAÇÃO GESSADA. ANÁLISE DE PROPRIEDADES
MECÂNICAS DO FÊMUR E DA DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRÁFICA
DO COLO FEMORAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ortopedia.

Área de Concentração: Ortopedia, Traumatologia
e Reabilitação do Aparelho Locomotor.

Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Cecim, Paulo Eugênio Santos

Uso do alendronato de sódio em ratas submetidas à imobilização gessada. Análise de propriedades mecânicas do fêmur e da densidade óssea radiográfica do colo femoral. Ribeirão Preto, 2007.

88p. : il. ; 30cm

Dissertação Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Imobilização, 2. Alendronato, 3. Osteopenia, 4. Densidade Óssea, 5. Biomecânica.

DEDICATÓRIA

Dedico a Nadia, Maria Clara e João Paulo

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço em especial ao Prof. Dr. José B. Volpon, idealizador deste trabalho e a quem muito estimo. Agradeço pelo privilégio de minha formação na especialidade de ortopedia pediátrica, por sua ética, dedicação, experiência, ensinamentos e disponibilidade para orientações nesta pesquisa e no dia-a-dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e possibilidade de realizações de meus sonhos e a Maria mãe de Jesus a quem dedico à maioria de minhas preces e sempre fui ouvido.

Agradeço a minha esposa Nadia, amiga e companheira que sempre esteve ao meu lado e próxima aos nossos filhos Maria Clara e João Paulo, suprimindo a minha ausência e torcendo pelo meu sucesso.

Agradeço a meus pais Eugênio e Teresinha que desde cedo me ensinaram o valor do trabalho e perseverança quando se busca um ideal. A minha avó Niobe pelas orações e carinho. Meus sogros Jonil e Araci e minha cunhada Mônica, pelo generoso apoio, confiança em mim depositada e por sempre contar e receber, apesar da distância.

Agradeço as secretárias do Departamento de Ortopedia, Fátima e Elisângela e aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que sempre me acolheram com muito carinho: Maria Terezinha, Francisco, Luiz Henrique, Moro, Reginaldo e Prof. Dr. Shimano, os quais estiveram sempre prontos e eficientes para o auxílio e conclusão de minhas atividades.

Agradeço ao amigo Marcos Shimano (pelo trabalho nos ensaios, orientações, finalizações e incentivos).

A amiga Juliana pela ajuda imprescindível nas etapas iniciais, a Suraya, João Paulo, Francisco, Vitor, Giovana, Liana, Leandro, Fabiano, Graziela, Sara, Daiana, Priscila, Patrícia e Rodrigo que me ajudaram na concretização deste trabalho, bem como ao amigo Dimitri Castro pelas comunicações pessoais durante a realização deste.

Ao Prof. Dr. Plauto C. A. Watanabe pelas análises densitométricas neste estudo.

Aos funcionários do Serviço de Radiologia do Centro de Ciências das Imagens e Física Médica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Eu preciso de tempo, tempo para parar
De tempo para pensar, me encontrar
Eu preciso de tempo, de criar tempo
De me dar tempo, tempo pra pensar em mim
Pra me ouvir, pra me respeitar e não me agredir.... porque
Só quem ouve é que sabe ouvir o outro
Só quem se respeita é que sabe respeitar o outro
Só quem se ama é que sabe amar o outro. Já foi dito:
“Ama a teu próximo como a ti mesmo”
Preciso me descobrir na missão de educando e educador
De aluno e professor
Na escola da vida onde ninguém é tão sábio
Que não tenha algo a aprender
E ninguém é tão aluno que não tenha nada a ensinar
Preciso descobrir atrás da cada colega um irmão a mim confiado
Semente de futuro mas fruto de um passado
Plantado num presente, conturbado e carente onde eu aconteço
Simplesmente
Eu não me punirei pelo mal que há no mundo
Mas não me perdoarei pelo bem que eu não fiz.”*

Luizinho

RESUMO

CECIM, P.E.S. **Uso de alendronato de sódio em ratas submetidas à imobilização gessada. Análise de propriedades mecânicas do fêmur e da densidade óssea radiográfica do colo femoral.** 2007. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A imobilização prolongada do aparelho locomotor, embora usada com finalidades terapêuticas, leva à osteopenia, o que causa enfraquecimento ósseo. Foi investigado se o uso concomitante do alendronato de sódio (um inibidor da atividade osteoclástica) é capaz de diminuir ou prevenir o enfraquecimento ósseo causado pela imobilização. Ratas fêmeas *Wistar*, adulta-jovens foram distribuídas em seis grupos: não imobilizado e sem tratamento (controle); não imobilizado + alendronato diário (0,1 mg/kg); não imobilizado + alendronato semanal (0,7 mg/kg); imobilizado e sem tratamento; imobilizado + alendronato diário (0,1 mg/kg); imobilizado + alendronato semanal (0,7 mg/kg). A imobilização foi obtida com aparelho gessado na região lombar, pélvica e de todo o membro pélvico direito (exceto a pata). O período de observação, imobilização e tratamento foi de 28 dias. Os métodos de avaliação foram a determinação da massa corporal, da massa e comprimento do fêmur direito, o ensaio mecânico em flexo-compressão no terço proximal do fêmur e a densidade óssea radiográfica do colo do fêmur direito. A comparação foi intergrupos. A imobilização, com alendronato ou não, causou diminuição significativa na massa corporal, enquanto que para a massa do fêmur ela diminuiu significativamente para os animais apenas imobilizados e não tratados. Com respeito à análise mecânica, houve sensível diminuição da força máxima e da rigidez nos animais apenas imobilizados. Os animais não imobilizados e que receberam alendronato de sódio (diário ou semanal) apresentaram maior resistência óssea, mesmo em relação ao controle não imobilizado e não tratado. Para os animais imobilizados e tratados (com

alendronato de sódio diário ou semanal) houve aumento da força máxima e da rigidez que se igualaram ou mesmo ultrapassaram os valores do controle não imobilizado e não tratado. A determinação da densidade óssea correspondeu aos achados nos ensaios mecânicos de tal forma que a correlação dela com a força máxima e com a rigidez foi positiva e linear. Foi concluído que a imobilização gessada causou acentuado enfraquecimento ósseo que foi prevenido eficientemente pelo uso do alendronato de sódio, tanto de aplicação diária ou semanal, caracterizados pelo aumento da força máxima e rigidez no ensaio de flexo-compressão, bem como aumento da densidade óssea radiográfica.

Palavras chave: imobilização, alendronato, osteopenia, densidade óssea, biomecânica.

ABSTRACT

CECIM, P.E.S. **Use of the sodium alendronate in rats submitted to plaster cast immobilization. Analysis of the mechanical properties of the femur and of the femoral neck radiographic density.** 2007. 88f. Dissertation – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Prolonged immobilization of the skeletal system has been used as an invaluable tool in the treatment of several orthopaedic conditions. However, as a side effect, it causes osteopenia and bone weakening. In this research it was investigated if the concomitant administration of sodium alendronate (a potent inhibitor of the osteoclastic activity) can prevent the bone weakening caused by immobilization. Young-adult female *Wistar* rats were distributed into six groups: non-immobilized and non-treated (control); non-immobilized + daily alendronate (0.1 mg/kg); non-immobilized + weekly alendronate (0.7 mg/kg); immobilized (no treatment); immobilized + daily alendronate (0.1 mg/kg); immobilized + weekly alendronate (0.7 mg/kg). Immobilization was achieved with a spica cast with inclusion of the right hindlimb. The period of pharmacological treatment and immobilization was 28 days. The evaluation consisted in the determination of the body mass, femoral mass, femur length, bending compression test of the proximal third of the femur and radiographic densitometry of the femoral neck. Inter-group evaluation was made. Immobilization with or without alendronate caused a significant decrease in the body mass. Conversely, the femur body mass significantly decreased in the immobilized in non-treated animals only. The mechanical tests showed that there was a significant reduction of the ultimate strength and stiffness for the immobilized and non-treated rats. When the animals were immobilized and received sodium alendronate (either daily or weekly) the femurs were stronger even in comparison in with the non-treated and non-immobilized animals (control). The immobilized and alendronate treated

animals (both schedules) displayed an increased stiffness and ultimate strength that were equal or even surpassed the non-treated controls. Bone density followed the mechanical results and relationship of such parameters showed a positive linear correlation. We concluded that the plaster cast immobilization caused a significant bone weakening that was efficiently prevented either by the daily or by the weekly subcutaneous administration of sodium alendronate. This was characterized by the increase of the ultimate strength and stiffness from bending compression tests as well as by the enhancement of the radiographic bone density.

Key words: immobilization, alendronate, osteopenia, bone density, biomechanics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama teórico representativo de ensaio mecânico de um corpo considerando a tensão $\times$ deformação. (A): origem; (B): limite de proporcionalidade; (C): força máxima; (D): limite de ruptura; área AB: área de deformação elástica; área BD: área de deformação plástica.....	31
Figura 2. A) Aspecto do animal com a região pélvica e o membro pélvico direito imobilizado. B) Animais imobilizados na gaiola.....	39
Figura 3. Animal imobilizado com aparelho gessado recebendo aplicação da solução de alendronato por via subcutânea, na região dorsal.....	40
Figura 4. Radiografia dos fêmures. A) Posicionamento dos ossos sobre o filme radiográfico, juntamente com o referencial densitométrico. B) Radiografia obtida.	42
Figura 5. Gráfico da intensidade de luminosidade obtido de imagem selecionada no programa de computador Adobe Photoshop CS2 9.0®.....	43
Figura 6. Detalhes das regiões selecionadas e os gráficos correspondentes. A) Seleção retangular da região dentro dos degraus do referencial densitométrico (seta). B) Seleção oval da região do colo femoral (seta).	44
Figura 7. Obtenção da densidade óssea (DO) do colo femoral, a partir de um referencial densitométrico de alumínio que foi radiografado juntamente com os ossos analisados.....	45
Figura 8. Inclusão da porção distal do fêmur. A) Molde de silicone com vários orifícios que terminam em cavidades esféricas. A abertura do orifício é maior próximo da superfície. B) Fêmur com a porção distal incluída em resina acrílica que forma um molde positivo da cavidade no silicone.	46
Figura 9. Conjunto preparado para o ensaio. A) A posição vertical do eixo longitudinal do fêmur foi obtida por comparação com um fio de prumo (seta). B) Conjunto acrílico-osso posicionado para o ensaio, com o pino de 2,0 mm de diâmetro colocado sobre a cabeça do fêmur.	47

Figura 10. Gráfico representativo da força x deformação obtido do ensaio mecânico do terço proximal do fêmur. Destaque para as propriedades mecânicas obtidas: força máxima e rigidez.	48
Figura 11. Valores médios da massa corporal final nos diferentes grupos e sua representação estatística:.....	50
Figura 12. Valores médios da massa do fêmur nos diferentes grupos e sua representação estatística:.....	52
Figura 13. Valores médios do comprimento do fêmur nos diferentes grupos e sua representação estatística:.....	54
Figura 14. Valores das médias da força máxima no ensaio de flexo-compressão dos fêmures nos diferentes grupos e sua representação estatística:	56
Figura 15. Valores das medidas da rigidez femoral nos grupos e suas representações estatísticas:	58
Figura 16. Média dos valores da densidade óssea no colo femoral do membro imobilizado e sua representação estatística:	61
Figura 17. Correlação entre a força máxima e a densidade óssea de todos os animais dos grupos.....	63
Figura 18. Correlação entre a rigidez e a densidade óssea de todos os animais dos grupos	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das perdas de animais por grupo	49
Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão da densidade óssea obtida da análise realizada no colo femoral do membro imobilizado.	60

SUMÁRIO¹

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Osso e fisiologia óssea.....	17
1.2	Osteopenia.....	22
1.3	Alendronato de sódio.....	25
1.4	Resistência mecânica	31
1.5	Justificativa.....	34
1.6	Objetivos	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Animais	36
2.2	Grupos experimentais.....	37
2.3	Imobilização	38
2.4	Alendronato	39
2.5	Análises.....	40
2.5.1	<i>Mensurações macroscópicas</i>	<i>41</i>
2.5.2	<i>Análise da densidade óssea</i>	<i>41</i>
2.5.3	<i>Análise mecânica.....</i>	<i>45</i>
2.5.4	<i>Análise estatística</i>	<i>48</i>
3	RESULTADOS.....	49
3.1	Mensurações macroscópicas.....	50
3.1.1	<i>Massa corporal</i>	<i>50</i>
3.1.2	<i>Massa do fêmur</i>	<i>52</i>
3.1.3	<i>Comprimento do fêmur</i>	<i>54</i>
3.2	Análise mecânica	56
3.2.1	<i>Força máxima</i>	<i>56</i>
3.2.2	<i>Rigidez.....</i>	<i>58</i>
3.3	Análise da densidade óssea.....	60
3.3.1	<i>Correlação entre densidade óssea e força máxima.....</i>	<i>63</i>
3.3.2	<i>Correlação entre densidade óssea e rigidez.....</i>	<i>64</i>

¹ Normas de acordo com as **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso** – São Paulo – 2004.

4	DISCUSSÃO	65
5	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICES	82
	ANEXOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

A estrutura óssea é constantemente submetida a estímulos mecânicos fundamentais para manter sua integridade. É uma estrutura rígida e, em situações de hipoatividade ou imobilizações por tempo prolongado, fica enfraquecida mecanicamente.

Uma situação clínica associada à perda de massa óssea, ou caracterizada por aumento da reabsorção e desequilíbrio na formação óssea pode levar a osteopenia. A osteopenia pode ser conseqüência de situações de imobilidade, como na lesão medular, trauma crânio-encefálico com repercussão motora, período prolongado no leito e por imobilizações. Embora a Ortopedia tenha evoluído no sentido de cada vez menos imobilizar o indivíduo e a Fisioterapia esteja atuando precocemente, ainda um contingente apreciável de adultos e crianças ficam com restrição da atividade física (hipoatividade) por períodos prolongados.

O enfraquecimento do tecido ósseo observado durante imobilizações gessadas por período prolongado é um desafio para o ortopedista que, freqüentemente, utiliza o gesso como um estabilizador mecânico e método de tratamento. Existem evidências de que a imobilização estimula a reabsorção e deprime a formação óssea (CAVANAGH; LICATA; RICE, 2005).

Assim, quando inevitável a imobilização, buscam-se meios de atenuar ou neutralizar os efeitos adversos da hipoatividade por meio de vários métodos. Dentre eles, o farmacológico. Muitos fármacos já foram testados com essa finalidade, sendo um dos mais recentes o alendronato de sódio.

1.1 Osso e fisiologia óssea

O osso é um tecido conjuntivo especializado, composto de elementos inorgânicos e orgânicos. Segundo Pritchard (1956), os componentes inorgânicos formam a matriz mineral, extracelular, composta de hidroxiapatita (íons cálcio, fosfato e hidroxila) e com quantidades variáveis de outros íons. Os elementos orgânicos formam uma matriz de colágeno e de proteínas não colágenas conhecidas como osteóides produzidos pelos osteoblastos, uma das células ósseas.

A parte celular especializada do tecido ósseo é composta pelo osteoblasto, pelo osteócito e pelo osteoclasto. Os osteoblastos são células de forma cúbicas, ricas em fosfatase alcalina. São derivadas da célula estromal indiferenciada e tem as características de células secretantes, com grande zona de Golgi e retículo endoplasmático abundante (WOOLF; DIXON, 1988).

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese do colágeno tipo I e mucopolissacárides que se localizam entre eles e a fronteira calcificada na forma de uma camada osteóide que é mineralizada. Os osteoblastos sintetizam collagenase, prostaglandina E2 e proteínas associadas ao osso (osteocalcina e osteonectina). Além disso, apresentam os receptores para o paratormônio (PTH), vitamina D, prostaglandinas E2 e glicocorticóides. Desenvolvem atividade parácrina na produção de citocinas que se relacionam com o recrutamento dos osteoclastos e com atividade autócrina na monitorização da formação óssea com a fosfatase alcalina óssea. (BARON, 1993).

Ao final da síntese da matriz osteóide, os osteoblastos da superfície permanecem alongados, formando as células de revestimento e os que estavam

dentro da matriz óssea, aproximadamente 10%, desenvolvem aspecto estrelado, transformando-se em osteócitos (BARON, 1993).

Junqueira e Carneiro (2004) descreveram que os osteócitos são importantes na biomecânica do osso, apesar de serem células com pequena atividade metabólica, pois se interligam com a superfície no momento em que acontece estresses mecânicos ou micro lesões e beneficiam o remodelamento local.

Os osteoclastos diferenciam-se histologicamente de outras células ósseas por serem células grandes, multinucleadas, que reabsorvem osso e cartilagem calcificada. São derivados de uma célula hematopoiética indiferenciada, da linhagem de células mononucleadas fagocíticas (PRITCHARD, 1956). São encontrados em uma cavidade formada pela sua atividade reabsortiva, denominada lacuna de Howship. Uma das suas características é ser uma célula bipolar que possui borda em escova, com pseudópodos que estão em contato com a superfície óssea e a borda lisa em contato com a medula óssea e a matriz (PRITCHARD, 1956).

Os osteoclastos produzem ácidos e ânions orgânicos quelantes de cálcio, secretados dentro do microambiente, importantes na desmineralização do osso. Eles também possuem um grande número de vacúolos e vesículas digestivas que secretam hidrolases ácidas e proteases neutras, necessárias para a degradação da matriz óssea, após sua desmineralização (BARON, 1993; WOOLF; DIXON, 1988). A atuação do osteoclasto promove a liberação de minerais e fragmentos do colágeno, que são utilizados como marcadores biológicos da reabsorção (WOOLF; DIXON, 1988).

O mecanismo de ação que ocorre na doença de Paget, nas metástases líticas e na osteoporose após a menopausa, baseia-se na atuação elevada do osteoclasto diminuindo a massa óssea pelo aumento da reabsorção (OLIVEIRA; GUIMARÃES,

2003). O osteoclasto é uma célula muito eficiente, no osso que está ativamente em remodelação, há um osteoclasto para cada seis osteoblastos (BARON, 1993).

O tecido ósseo pode ser classificado com base na estrutura microscópica e porosidade em osso esponjoso (trabecular) e cortical (compacto). O tecido ósseo compacto apresenta densidade maior e porosidade de 5% a 10% em sua estrutura, enquanto o osso trabecular apresenta porosidade que vai de 50% a 90% (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O papel estrutural do osso em resistir aos esforços mecânicos e permanecer metabolicamente estável sob condições normais tem relação com seu conteúdo mineral, que é armazenado, tanto no osso cortical como no trabecular (WOOLF; DIXON, 1988).

O osso cortical está presente na superfície externa de todos os ossos e constitui quase 80% da massa esquelética. Contudo, a sua maior frequência é encontrada nas estruturas colunares dos ossos longos, as diáfises. A disposição do osso compacto em lamelas dispostas concentricamente ao redor de pequenos canais centrais constitui o sistema de Havers (haversiano) ou *ósteon* (PRITCHARD, 1956).

Dentro dos canais haversianos há ramos dos vasos intracorticais juntamente com vênulas. Estes canalículos vasculares de interconexão entre os osteócitos permitem movimentação de fluidos, nutrição e intercomunicação humoral (PRITCHARD, 1956).

O osso trabecular esponjoso é responsável pelos restantes 20% da massa esquelética, está presente nas epífises dos ossos longos, nos corpos vertebrais, em ossos curtos e na crista ilíaca (BARON, 1993).

O osso normal pode ser formado pela ossificação intramembranosa dos osteoblastos do mesênquima ou por ossificação endocondral de modelos cartilaginosos pré-existentes. A combinação destes dois processos aumenta em tamanho os ossos longos e as vértebras. A ossificação da diáfise dos ossos longos na vida pós-natal é intramembranosa. A deposição subperiosteal de osso novo alarga a diáfise e, concomitantemente, há reabsorção da região endosteal que alarga o canal medular. Os ossos longos crescem em comprimento por ação da cartilagem na placa de crescimento em um processo que é resultado do crescimento pericondral, encondral e ossificação (WOOLF; DIXON, 1988).

Segundo Oliveira e Guimarães (2003), o tamanho e a forma de cada osso e do esqueleto total são predeterminados geneticamente. Mas, a expressão deste potencial é influenciada pelo crescimento e pelo ambiente, contribuindo para esta ação a nutrição, força física, fatores endócrinos e fatores de crescimento locais. A modulação do crescimento promove, desta forma, as características do esqueleto como uma macroarquitetura e possibilita que ele possa ajustar-se às demandas mecânicas.

Woof e Dixon, em 1988, já descreviam que há grande variação no tamanho do esqueleto entre e dentre as raças. Fatores genéticos são importantes, mas torna-se difícil separá-los das diferenças ambientais tais como hábitos alimentares e atividades físicas. Os negros têm ossos maiores que os brancos, enquanto, que os chineses apresentam menor massa esquelética.

A remodelação do osso cortical é, primeiramente, realizada pelos osteoclastos que se movimentam progressivamente formando um cone por meio do osso mineralizado antigo, a fim de originar uma lacuna para um novo sistema haversiano (PRITCHARD, 1956).

Ocorre um intercâmbio intersticial muito maior no osso trabecular que no osso cortical (BARON, 1993; WOOLF; DIXON, 1988). O trabalho é sincronizado de tal forma que a reabsorção em um local é equilibrada pela formação em outro, sem enfraquecimento do esqueleto (WOOLF; DIXON, 1988).

A reabsorção aumentada no osso cortical acarreta canais haversianos mais numerosos e mais amplos, com aumento da porosidade cortical, e no osso trabecular, ocorre perda das trabéculas intactas com aumento do número das espículas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A diminuição da mobilidade de um segmento do corpo (seja por meio do repouso no leito, sob a forma de imobilização de um membro de aparelho gessado ou paralisia) determina a perda de massa óssea. Julius Wolff estabeleceu, em 1892, que os ossos formam-se e remodelam-se em resposta às forças mecânicas aplicadas sobre eles. As orientações das trabéculas modificam-se de acordo com o estresse. Por meio de variações nas porcentagens de absorção endosteal e formação periosteal também é alterada a espessura da córtex. Em última análise, os osteoclastos e os osteoblastos tornam-se os agentes efetores da lei de Wolff, por ação de um estímulo mecânico direto ou indireto (OLIVEIRA; GUIMARÃES, 2003).

1.2 Osteopenia

De acordo com Stedman (1987, p. 977) diferencia-se osteopenia de osteoporose por se descrever:

[...] osteopenia (do grego *ὀστέον*: osso + *πενία*: pobreza) 1. Como uma diminuição da calcificação ou da densidade do osso, termo descritivo aplicável a todos os sistemas esqueléticos em que se observa tal condição e não tem implicação de causalidade. 2. Diminuição da massa óssea em virtude da síntese osteóide inadequada.

[...] osteoporose (do grego *ὀστέον*: osso + *πορος*: poro + *οἷς*: condição) é a redução da quantidade de osso ou atrofia do tecido esquelético; ocorre nas mulheres depois da menopausa e nos homens idosos, resultando nas trabéculas ósseas que são escassas, finas e sem reabsorção osteoclástica.

A osteoporose é uma doença metabólica que, inicialmente, é assintomática. É considerada por alguns autores como a “epidemia silenciosa do século XX” ou ainda “a doença traiçoeira”, com um risco aumentado de fraturas (GUARNIERO; OLIVEIRA, 2004).

O diagnóstico clínico da osteopenia está baseado na redução considerável da densidade mineral óssea (DMO), entre 1 e 2,5 desvios padrão abaixo da média da população adulta-jovem analisada pela densitometria óssea. Para o diagnóstico de osteoporose considera-se a presença de fratura que ocorre após trauma mínimo ou na redução da DMO em 2,5 ou mais desvios padrão abaixo da média para a população adulta-jovem do mesmo gênero (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; FLEISCH, 2003; JOHNSTON et al., 1994).

A porção do osso representada por aproximadamente 60% de seu conteúdo mineral confere resistência à estrutura óssea. A matéria orgânica (colágeno tipo I e células ósseas) representa os 40% restantes (BARON, 1993). A resistência do osso

é o reflexo da integração entre a densidade mineral e a qualidade. A densidade pode ser medida por meio da densitometria óssea e a qualidade óssea é representada pela arquitetura do osso, metabolismo, mineralização, e nas propriedades biomecânicas (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005).

Para estudar a osteopenia os pesquisadores utilizaram diversos modelos de animais de laboratório como cães, ovelhas, ratos, camundongos e macacos (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; HORNBY et al., 1994; JIANG et al., 2005; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; MOSEKILDE, 1995; SIETSEMA, 1995).

Entre os métodos preconizados para o estudo da osteopenia estão as condições de alterações endócrinas causadas por ovariectomia, orquidectomia, hipofisectomia, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo e excesso de corticóides (CARVALHO; CLIQUET, 2003; GIARDINO et al., 1997; HUUSKONEN et al., 2001; ITO et al., 2002; KE et al., 2005; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991; THOMPSON et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1993), o desuso provocado por imobilização com bandagens (COUTINHO et al., 2002; EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; LENTLE; KRUGER, 2005; MOSEKILDE et al., 2000), aparelho gessado (JOZSA et al., 1988; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995), suspensão pela cauda (BIKLE; SAKATA; HALLORAN, 2003; KUROKOUCHI et al., 1996; KUROKOUCHI et al., 1997), neurectomia do ciático (BRIGHTON et al., 1985; ZHAO; JIANG; GENANT, 1999), repouso prolongado no leito (LEBLANC et al., 2002) e ainda, condições dietéticas após gastrectomia, dieta restrita em cálcio, excesso de fósforo e deficiência de vitamina D (ANDERSSON et al., 2002).

Em animais, o método utilizado com maior frequência é a ovariectomia em ratas que perdem osso esponjoso em tíbia proximal e vértebra lombar em tempo

curto, após a cirurgia, como resultado direto da deficiência estrogênica, com reabsorção maior que a formação. Esta perda óssea é obtida após oito semanas; em humanos a perda é detectada após um ano (SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991).

A imobilização de ratos provoca perda de osso esponjoso caracterizada por falhas na formação óssea e aumento na reabsorção. A perda focal também ocorre em osso cortical quando a imobilização é prolongada, com concomitante diminuição nas propriedades mecânicas (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995).

Jozsa et al. (1988) mostraram, com a imobilização gessada em joelhos de ratos, durante períodos de uma, duas e três semanas, que a porosidade aumentou progressivamente em 7,0%, 8,5% e 8,9%, respectivamente. Brighon et al. (1985) seccionaram o nervo ciático para induzir osteopenia na tíbia e concluíram que, após 28 dias, a porosidade no membro imobilizado foi 12% maior, comparado com o membro contralateral que foi de 1,9%.

Hott et al. (2003), com imobilização gessada durante dez dias, em ratos de nove semanas de idade, promoveram osteopenia confirmada pela diminuição da densidade da tíbia, analisada pela histomorfometria.

1.3 Alendronato de sódio

Chamam-se bisfosfonatos os compostos sintéticos análogos do pirofosfato utilizados para inibir a reabsorção óssea mediada pelo osteoclasto e para o tratamento de doenças osteolíticas como a osteoporose. Seus efeitos anti-reabsortivos são bem documentados na literatura (FLEISCH, 1987; FLEISCH, 2003; MORRIS; EINHORN, 2005; PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991; SRIVASTAVA; ALON, 2003; SZEJNFELD, 2000; ZHAO; JIANG; GENANT, 1999) e a potência biológica depende de sua estrutura química individual. Como exemplos há o etidronato, pamidronato, risedronato, clodronato, alendronato, ibandronato e zolendronato (MARCUS, 2003; PETER; KINDT; MAJKA, 1998).

O alendronato de sódio, ou simplesmente alendronato, é um *monossódio 4-amino-1-hidroxibutilidina bisfosfonato*. O grupo amino da cadeia superior é de grande seletividade para inibir a reabsorção óssea e significativamente eficiente, sem afetar na mineralização óssea, o que não era observado no etidronato, um dos primeiros bisfosfonatos usados clinicamente e que não continha o nitrogênio (FLEISCH, 1987; GUY et al., 1993; MARCUS, 2003; MORRIS; EINHORN, 2005; PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999; SZEJNFELD, 2000).

A localização do alendronato no osso e o seu efeito no osteoclasto foram estudados por Hayes, Shea e Rodan (1999), com injeção de alendronato marcado radioativamente e pela análise com microscopia eletrônica. Após quatro horas, 10 vezes mais alendronato foi localizado sobre osteoclastos que osteoblastos. Doze horas após a injeção, o alendronato foi encontrado exclusivamente na superfície de

reabsorção do osteoclasto. O estudo mostrou que o alendronato desencadeou mudanças na morfologia do osteoclasto e a membrana responsável por suas ligações e secreções de enzimas estava ausente após 48 horas da administração.

Estudos em animais de laboratório indicaram que, administrada sistemicamente, a droga foi rapidamente levada ao tecido ósseo ou excretada pelos rins. Aproximadamente 60% a 70% da dose é levada ao osso e sua meia vida é de aproximadamente 200 dias no rato e 100 dias em cães (HAYES; SHEA; RODAN, 1999). Após sete semanas de alendronato endovenoso com marcador radioativo em ratos, esses autores observaram que o alendronato foi incorporado à matriz óssea e um novo osso foi formado com quantidade e qualidade normal. A conclusão foi que o alendronato não inibiu a formação óssea, não atuou no osteoclasto após incorporação na matriz óssea e não levou a efeitos anti-reabsortivos cumulativos (FLEISCH, 2003).

O alendronato incorporado pela matriz óssea neoformada apresenta efeito similar ao da oxitetraciclina que é depositada no osso ao longo da superfície neo-mineralizada. Esta ação da oxitetraciclina é explorada por estudos que investigam a formação óssea por meio da marcação com fluorescência (PAZ et al., 2001; PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991; VOLPON, 1985).

Quanto à distribuição, uma dose intravenosa de alendronato em ratos é distribuída pelo sangue e depositada principalmente em locais em que o esqueleto apresenta reabsorção ativa, em proporção maior em osso trabecular, quando comparada com osso cortical e maior na metáfise que na diáfise (LEBLANC et al., 2002; MARCUS, 2003; PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

Como os outros bisfosfonatos, a absorção oral do alendronato é limitada na presença de alimentos. A bioviabilidade oral do alendronato é estimada como 0,9% no rato, 1,8% no cão e 1,7% no macaco. A administração oral em ratos na presença de alimentos diminui a bioviabilidade em seis vezes. O alendronato é absorvido por segmentos do trato gastrintestinal com maiores áreas de superfície, sendo o jejuno melhor que o duodeno e este melhor que o íleo. Por isso, orienta-se que após a dose oral em humanos, a pessoa permaneça sem deitar no mínimo por 30 minutos para condução da droga para locais de melhor absorção intestinal e para prevenir refluxo esofágico (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

Após cinco minutos da administração endovenosa de alendronato, 63% da dose fica presente em tecidos não calcificados. Após uma hora, a droga é reduzida para 5% e, em vinte e quatro horas, por volta de 1%. No osso, a quantidade de 30% da dose é encontrada cinco minutos após a administração endovenosa e eleva-se para 60% a 70% após uma hora e permanece constante nas próximas 72 horas (BATCH et al., 2003).

A dose tóxica do alendronato foi estudada em animais. Por via oral, em ratos, é de aproximadamente 552 mg/kg (3256 mg/m² equivalente à dose oral de humanos de 27.800 mg), em camundongos 966 mg/kg (2898 mg/m² equivalente à dose oral de humanos de 48.300 mg). A dose intravenosa foi dez a quinze vezes menor que os valores da dose oral. Após a administração oral, os animais apresentaram primariamente alterações gastrintestinais e hemorragias com evolução para o óbito (PETER; RODAN, 1999; PETER; KINDT; MAJKA, 1998).

Em doses terapêuticas, os efeitos adversos mais comuns dos bisfosfonatos são distúrbios gastrintestinais como desconforto abdominal, dor e diarreia. Exames microscópios de secção do estômago de ratos revelaram que a irritação é dose

dependente e que a causada pelo alendronato é menor se comparada ao risedronato e ao etidronato (PETER; KINDT; MAJKA, 1998).

Em 1993, Guy et al. utilizaram alendronato administrado por via oral em ratos durante 105 semanas. Os resultados comprovaram, por análise radiográfica da coluna lombar, análise da descalcificação da quarta vértebra lombar e pelo ensaio mecânico de compressão em três pontos do fêmur inteiro, que o alendronato administrado desde o crescimento inibiu a reabsorção óssea causando aumento da massa e atenuação da reabsorção durante o período da idade em que a perda óssea mais ocorreria. Mas, os autores descreveram importantes limitações. O estudo começou com machos e fêmeas de cinco semanas de idade, e as análises mostraram que o peso acumulado em machos foi aproximadamente 50% maior que nas fêmeas. Atribuiu-se que este volume corporal interferiu nos resultados dos ensaios. Também, em função da idade dos animais para completar o estudo (105 semanas), ocorreu morte de aproximadamente 80% dos ratos por causas não relacionadas com o tratamento.

Em 1997, Giardino et al. compararam os efeitos da calcitonina e do alendronato no tratamento da osteopenia em ratos ovariectomizados e concluíram que ambos podem reduzir a perda óssea de forma semelhante.

Em 2001, o trabalho de Paz et al., comparou os efeitos preventivos do alendronato, por seis semanas, em ratos previamente ovariectomizados, com o do hormônio estrogênio sintetizado. Pela avaliação com densitometria, histomorfologia e análises químicas, foi concluído que, com as doses utilizadas, ambas as drogas foram efetivas, mas o alendronato na dose de 0,1 mg/kg/dia alcançou melhores resultados.

Millett, Allen e Bostrom (2002) analisaram a osteólise periférica induzida por um implante de polietileno como parte de modelo experimental no joelho de ratos, como acontece em próteses totais articulares. Na quarta semana pós-operatória, após ser observado a osteólise no grupo controle, foi iniciado o alendronato na dose de 0,01 mg/kg/dia, aplicada subcutaneamente. O alendronato preveniu e ou ao menos atrasou o processo de perda óssea e a massa óssea na região proximal da tíbia apresentou aumento significativo após a administração do alendronato.

Segundo Guarniero e Oliveira (2004), os bisfosfonatos mais estudados como agentes que diminuem a reabsorção óssea a atuar sobre os osteoclastos são o alendronato e o risedronato, e podem ser indicados como terapia na osteoporose, tanto para mulheres, como para homens e para o tratamento da osteoporose secundária induzida por corticóides.

Em 2002, Ito et al. combinaram os efeitos do alendronato e vitamina D (1-alpha hidroxivitamina D3) para tratamento de ratos ovariectomizados com uso apenas do alendronato. Comparativamente, por meio da densitometria, histologia e tomografia computadorizada, foram observados melhores resultados com a associação, e assim, torna-se uma alternativa promissora para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.

Segundo Batch et al. (2003), o uso de bisfosfonatos diminuiu a morbidade promovida pela osteopenia encontrada na osteogênese imperfeita, displasia fibrosa e osteoporose idiopática juvenil, além de ser utilizado nas metástases de câncer de mama, mieloma múltiplo e tumor gigantomcelular.

Em 2003, Srivastava e Alon, descreveram o uso de vários bisfosfonatos como adjuvantes no tratamento da osteoporose encontrada em crianças com paralisia cerebral, osteogênese imperfeita, beta-talassemia, ossificação heterotópica e

doença de Gaucher. Outros autores descreveram os resultados de trabalhos com uso de bisfosfonatos em modelos animais na afecção de Legg-Calvé-Perthes visando a atenuar a fase de reabsorção pela ação anti-osteoclástica. Conseguiram diminuir a progressão da doença (MORRIS; EINHORN, 2005).

Leblanc et al. (2002), simulando o efeito da ausência da gravidade de vôos espaciais, analisaram vinte e um indivíduos que ficaram reclusos no leito durante dezessete semanas. Indivíduos tratados com alendronato apresentaram melhores resultados densitométricos e laboratoriais de cálcio e eletrólitos que o grupo controle.

1.4 Resistência mecânica

O protocolo de 1995 do *FDA (Food and Drug Administration)* - Departamento Americano de Controle de Medicamentos e Alimentos - definiu que, para pesquisas pré-clínicas em modelos de animais para osteoporose, as análises mecânicas são fundamentais para testar a qualidade óssea, promovendo informações em relação à influência do agente e teste realizado (MOSEKILDE, 1995).

Quando é feita a análise das propriedades mecânicas de materiais é obtido o comportamento e características próprias de cada um deles. Os materiais biológicos são anisotrópicos, ou seja, apresentam respostas mecânicas variáveis, diferentemente dos metais, considerados substâncias isotrópicas.

A resposta de um material (corpo) frente a uma carga (força) aplicada e a deformação promovida pode ser quantificada em um gráfico: tensão x deformação.

Figura 1. Diagrama teórico representativo de ensaio mecânico de um corpo considerando a tensão x deformação. (A): origem; (B): limite de proporcionalidade; (C): força máxima; (D): limite de ruptura; área AB: área de deformação elástica; área BD: área de deformação plástica.

O diagrama tensão x deformação (Figura 1) permite caracterizar diversos parâmetros. No eixo das abscissas estão os valores da deformação ϵ , no eixo das ordenadas, os valores das tensões (NASH, 1977). A curva formada pode ser dividida em região de deformação elástica e região de deformação plástica (Figura 1). A primeira corresponde a um segmento de reta que termina no limite de proporcionalidade (A→B). A segunda corresponde à região de deformação plástica, sendo representada pelo trecho compreendido entre o limite de proporcionalidade (B) e o ponto correspondente à ruptura do material (B→D) (NASH, 1977).

Limite de proporcionalidade (B) representa o valor máximo da tensão, abaixo do qual o material obedece à lei de Hooke. O limite de elasticidade é muito próximo ao (B) e representa a tensão máxima que pode ser aplicada ao material sem que apareçam deformações residuais, ou permanentes após a retirada integral da carga externa. Limite de ruptura (D): a tensão correspondente ao ponto D é a que corresponde à falência do material. Carga máxima (C) é o valor máximo da tensão suportada pela estrutura durante o ensaio (NASH, 1977).

Chama-se módulo de resiliência a energia que o corpo armazena por unidade de volume quando, a partir do zero, é elevado o valor da tensão até o limite de proporcionalidade. Assim, a resiliência de um material é a sua capacidade de absorver energia na região elástica. O módulo de tenacidade é a energia que o corpo armazena, por unidade de volume, quando, a partir de zero, há aumento da tensão até a ruptura. A tenacidade de um material é sua capacidade de absorver energia na região plástica (NASH, 1977).

Fazem parte das propriedades mecânicas a dureza que é a resistência do material a ser penetrado; a ductibilidade que é a capacidade do material em se deformar; a fragilidade, que é a capacidade em quebrar-se com o mínimo de

deformação e o módulo de elasticidade, que é uma medida da rigidez do material determinada na fase elástica (SOUZA, 1982).

A fratura de um osso ocorre porque alguma região dele foi deformada além do limite de tolerância. Primeiro, em forma reversível elástica e, em seguida, em deformidade plástica (indução de micro fraturas). Isto gera sofrimento mecânico interno da estrutura (estresse), o suficiente para vencer a resistência final do material e causar a solução de continuidade. A resistência depende da qualidade mecânica (rigidez específica) e da distribuição espacial (macroarquitetura) do material calcificado (FERRETTI et al., 1997).

A característica mecânica do material ósseo é função de sua microarquitetura: entremeamento das fibras colágenas, emplacamento e ordenação dos cristais de hidroxiapatita sobre as fibras e, ainda, do grau de mineralização, estimada pela densidade óssea mineral volumétrica. A macroarquitetura óssea é caracterizada pela forma, tamanho e a trama visível da estrutura resultante do ordenamento direcional da modelação e da remodelação (FERRETTI et al., 1997).

Só é possível avaliar a qualidade mecânica óssea (ou eficiência de um osso ou parte deste como estrutura de sustentação) se for possível estimar tanto a qualidade quanto a distribuição do material ósseo na região considerada. Isto se deve em função da direção da força deformante que, eventualmente, determina a fratura (FERRETTI et al., 1997).

1.5 Justificativa

A efetividade do alendronato de sódio em comparação com outras substâncias utilizadas para o tratamento da osteoporose já está bem definida por vários estudos (ANDERSSON et al., 2002; LEBLANC et al., 2002; MORRIS; EINHORN, 2005; PAZ et al., 2001). Porém, uma das questões a ser caracterizada é o quanto esta terapia confere maior resistência ao osso.

Apesar do tratamento das lesões traumáticas do aparelho locomotor ter evoluído no sentido de mobilização precoce, ainda há pacientes que, por condições especiais (traumatismos graves, lesões crânio-encefálicas, traumatismos raqui-medulares), ficam imobilizados por aparelho gessados, fixadores externos e trações, por longos períodos e, além das conseqüências próprias decorrentes do trauma, podem sofrer enfraquecimento ósseo com o período de inatividade. Isto pode levar à fratura durante a hospitalização e na fase de reabilitação.

Assim, segundo vários autores (BIKLE et al., 2003; EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; KE et al., 2006; LEBLANC et al., 2002; MOSEKILDE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004) é importante a pesquisa de medidas farmacológicas que tentem evitar essas complicações como o alendronato de sódio, utilizado nesta investigação.

1.6 Objetivos

Objetivo geral

Analisar por meio de propriedades mecânicas obtidas com o ensaio de flexo-compressão no terço proximal do fêmur e da densidade óssea se a administração de alendronato de sódio pode prevenir o enfraquecimento no fêmur causado pela imobilização gessada de ratas adulta-jovens.

Objetivos específicos

1. Avaliar a ação do alendronato de sódio sobre a resistência mecânica e a densidade óssea radiográfica do fêmur de ratas imobilizadas.
2. Avaliar a ação do alendronato de sódio sobre a resistência mecânica e a densidade óssea radiográfica do fêmur de ratas normais.
3. Estabelecer a correlação de força máxima e rigidez, obtidas com o ensaio mecânico de flexo-compressão do terço proximal do fêmur, com a densidade óssea radiográfica do fêmur.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996), e aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob Protocolo nº. 05.1.1117.53.6/2006 (ANEXO A).

2.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas de *Rattus norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, com massa corporal entre 250 g e 300 g, fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram pesados no início do experimento com balança digital de precisão de 0,1 g e observados quanto ao estado geral e condições específicas das patas traseiras. Os animais selecionados foram alojados em número de dois em gaiolas plásticas comuns (40 x 33 x 20 cm) e mantidos no biotério do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com acesso à água e alimentação (ração padrão), sob controle de temperatura ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12 x 12 horas claro/escuro).

2.2 Grupos experimentais

As ratas foram divididas aleatoriamente em seis grupos experimentais de doze animais cada, no início do experimento. Entretanto, com algumas perdas, os grupos ficaram com número menor de animais. A caracterização de cada grupo está apresentada no Quadro 01.

Quadro 01. Agrupamento dos animais

Grupos		Descrição dos grupos
Controle (sem tratamento)	C	10 ratas que permaneceram nas gaiolas por 28 dias.
Não imobilizadas + alendronato diário	ALN/D	10 ratas que permaneceram nas gaiolas e receberam doses diárias (0,1 mg/kg) de alendronato por 28 dias.
Não imobilizadas + alendronato semanal	ALN/S	10 ratas que permaneceram nas gaiolas e receberam doses semanais (0,7 mg/kg) de alendronato por 28 dias.
Imobilizadas	I	9 ratas que foram imobilizadas com aparelho gessado por 28 dias.
Imobilizadas + alendronato diário	I+ALN/D	7 ratas que foram imobilizadas com aparelho gessado e receberam doses diárias (0,1 mg/kg) de alendronato por 28 dias.
Imobilizadas + alendronato semanal	I+ALN/S	9 ratas que foram imobilizadas com aparelho gessado e receberam doses semanais (0,7 mg/kg) de alendronato por 28 dias.

2.3 Imobilização

A imobilização utilizada foi por meio de aparelho gessado que incluiu a região lombar, pelve e o membro pélvico direito, realizado segundo a técnica descrita por Carvalho, Shimano e Volpon (2002). Para aplicação do aparelho gessado, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com xylazina 20% (Rompun[®], Bayer, São Paulo, SP, Brasil) 12 mg/kg e ketamina 10% (Ketalar[®], Parke-Davis, Buenos Aires, Argentina) 95 mg/kg, como descrito por outros autores (COUTINHO et al., 2002; PAZ et al., 2001).

Com o animal anestesiado, a região a ser imobilizada foi envolvida por malha tubular e ataduras de algodão, com a finalidade de proteger a pele. Na sequência, foram utilizadas ataduras gessadas de 6,0 cm de largura de forma circular e uniforme, com o cuidado de não provocar compressão no membro ou causar áreas irregulares de apoio. O membro pélvico direito foi imobilizado com o quadril em extensão, discreta abdução e joelho em extensão (Figura 2) (CARVALHO; SHIMANO; VOLPON, 2002). O aparelho gessado foi recortado de modo a deixar livre a região perineal, a pata direita e todo o membro pélvico esquerdo. As ratas foram inspecionadas diariamente para verificar possíveis complicações com a imobilização.

Os animais foram mantidos em número de dois por gaiola, forrada com maravalhas, com acesso à água e à ração comum. No final do experimento, o aparelho gessado foi removido com serra de gesso, com o animal sedado com as mesmas dosagens de xylazina e ketamina.

Figura 2. A) Aspecto do animal com a região pélvica e o membro pélvico direito imobilizado. B) Animais imobilizados na gaiola.

2.4 Alendronato

O alendronato foi manipulado da substância pura (alendronato sódico trihidratado 1%) (ANEXO B), acondicionado em frasco-ampolas de 10,0 mL na concentração de 10,0 mg/mL, que é a máxima concentração em que se mantém solúvel.

As doses utilizadas foram de 0,7 mg/kg aplicadas uma vez por semana ou 0,1 mg/kg aplicada uma vez por dia, durante 28 dias (PAZ et al., 2001; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991). As aplicações foram subcutâneas na região dorsal do animal com seringa de 1,0 mL e agulha de 12,7 x 0,33 mm (Figura 3) (HUUSKONEN et al., 2001; PAZ et al., 2001; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991). A massa corporal utilizada para o cálculo da dosagem foi aquela do início do experimento.

Figura 3. Animal imobilizado com aparelho gessado recebendo aplicação da solução de alendronato por via subcutânea, na região dorsal.

2.5 Análises

Os animais foram mortos por meio de dose excessiva de tiopental sódico (Thionembital[®], Abbott do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), administrado intraperitonealmente. O aparelho gessado foi removido, o animal pesado e o fêmur do lado imobilizado foi desarticulado no quadril e joelho e limpo das partes moles.

Após inspeção macroscópica, os ossos foram envolvidos em gases umedecidas em solução de soro fisiológico e estocados em “freezer”, à temperatura de -20 °C.

Para as análises, os ossos foram retirados do “freezer” com antecedência de 12 horas e colocados em geladeira à temperatura média de 4 °C para descongelamento gradual.

2.5.1 Mensurações macroscópicas

O fêmur direito foi pesado em balança com precisão de 0,01 g e realizada a medida com paquímetro digital da distância do ápice do grande trocânter à extremidade do côndilo lateral do fêmur (comprimento do fêmur) (McHUGH et al., 2002).

2.5.2 Análise da densidade óssea

A análise da densidade óssea foi realizada pelo método da densitometria óptica radiográfica (LOUZADA; FERREIRA; NOGUEIRA, 2001; WATANABE et al., 2006). O fêmur direito foi radiografado em incidência antero-posterior, juntamente com um referencial densitométrico formado por uma escada de liga de alumínio (liga 6063 ABNT) de 12 degraus de 0,5 mm de altura cada um. Este referencial foi colocado no centro do filme e do foco de radiação, com os fêmures posicionados perpendicularmente a ele e de maneira simétrica (LOUZADA; FERREIRA; NOGUEIRA, 2001) (Figura 4A).

As radiografias (Figura 4B) foram realizadas com aparelho de raios-x marca Philips Super M 80[®] do Centro de Ciências das Imagens e Física Médica (CCIFM) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, com distância foco-filme de 1,0 m e ajustado para exposição de 45 kVp e 2,5 mA. Foram utilizados filmes radiográficos de mamografia (20 cm x 25 cm) marca Kodak[®] e o processo de fixação e revelação foi realizado em processadora automática.

Figura 4. Radiografia dos fêmures. A) Posicionamento dos ossos sobre o filme radiográfico, juntamente com o referencial densitométrico. B) Radiografia obtida.

A análise das radiografias foi realizada no Laboratório de Análises e Controle de Imagem Radiográfica Odontológica (LACIRO) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Plauto Watanabe.

As radiografias foram digitalizadas em um “scanner” profissional (Epson modelo - Expression 636[®]), controlado pelo programa de computador Epson scanner II 32, versão 2.10E[®] (1994). Utilizando como fonte de documento: *TPU for Pos. Film*; o tipo de imagem: *black and white photo*; a resolução de 600 pixels/polegada ou 236,22 pixels/cm e o destino: *screen (general)*. As imagens foram armazenadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

Para a análise das imagens foi utilizado o histograma da intensidade das escalas de tons no “canal luminosidade” do programa de computador Adobe

Photoshop CS2 9.0.® O eixo horizontal do histograma representa os valores de intensidade (ou níveis), do mais escuro (0), que se localiza na extremidade esquerda, ao mais claro (255), na extremidade direita. O eixo vertical representa o número de “pixels” (Figura 5). Obtém-se um gráfico da escala de tons da imagem e o tipo de registro da imagem. Uma imagem de registro baixo contém detalhes concentrados nas sombras (escuro ou radiolúcidas); uma imagem de registro alto contém detalhes concentrados nos realces (tecido ósseo mais denso). Finalmente, uma imagem de registro médio contém detalhes concentrados nos tons médios (OLIVEIRA et al., 2006; WATANABE et al., 2006).

Figura 5. Gráfico da intensidade de luminosidade obtido de imagem selecionada no programa de computador Adobe Photoshop CS2 9.0®.

De cada radiografia foi obtido o valor da média da intensidade de luminosidade de cada degrau do referencial densitométrico (escala de alumínio) (Figura 6A). Em seguida, foi feita a seleção de uma área com formato oval da região do colo femoral de cada fêmur radiografado, para obter o valor médio de intensidade

de luminosidade da região (Figura 6B). O tamanho da seleção foi individual para cada osso analisado e procurava incluir todo o osso trabecular do colo do fêmur.

Figura 6. Detalhes das regiões selecionadas e os gráficos correspondentes. A) Seleção retangular da região dentro dos degraus do referencial densitométrico (seta). B) Seleção oval da região do colo femoral (seta).

Cada degrau do referencial densitométrico possui espessura conhecida (E), que correspondeu ao valor médio de luminosidade (L). O valor médio de luminosidade da região selecionada do osso (LO) vai estar sempre entre dois valores de L do referencial. Portanto, foi possível determinar a densidade óssea (DO), em milímetros de alumínio, realizando uma proporção direta dos termos (Figura 7).

Figura 7. Obtenção da densidade óssea (DO) do colo femoral, a partir de um referencial densitométrico de alumínio que foi radiografado juntamente com os ossos analisados.

2.5.3 Análise mecânica

Após os procedimentos radiográficos, os fêmures foram ensaiados mecanicamente em flexo-compressão na região do terço proximal. O ensaio foi realizado em máquina universal de ensaio EMIC® - 10000 N do Laboratório de

Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. A máquina foi conectada a um microcomputador que utilizou o “software” TESC[®] para controle dos movimentos e transcrição da força e deslocamento.

Previamente, a extremidade distal do fêmur foi incluída em cimento acrílico. Para tanto, foi confeccionado um molde de silicone ASB-10 polipox[®] com cavidades esféricas de 2,8 mm de diâmetro (Figura 8A), segundo adaptação do método idealizado por Castro (2006)². O cimento acrílico utilizado foi o polimerizante JET – Clássico[®] na proporção de 2,0 mL de volume de pó para 1,0 mL de solvente. A mistura foi vertida no molde de silicone, o fêmur colocado verticalmente no orifício e fixado com discos de borracha no molde. Após a polimerização, o conjunto acrílico-osso foi retirado do molde (Figura 8B).

Figura 8. Inclusão da porção distal do fêmur. A) Molde de silicone com vários orifícios que terminam em cavidades esféricas. A abertura do orifício é maior próximo da superfície. B) Fêmur com a porção distal incluída em resina acrílica que forma um molde positivo da cavidade no silicone.

² Informação fornecida por Castro D.A., em Ribeirão Preto, em 2006.

O conjunto foi preso pela esfera de acrílico em morsa bidimensional (dois graus de liberdade de movimentação no plano horizontal). A extremidade esférica possibilitou que o conjunto fosse mobilizado nos três planos, até que o eixo longitudinal do fêmur ficasse na vertical, por comparação com um fio de prumo (Figura 9A).

Foi aplicada força vertical na cabeça femoral por meio de pino metálico de 2,0 mm de diâmetro conectado diretamente à célula de carga com capacidade máxima de 50 kgf (Figura 9B). A velocidade de aplicação da força foi de 0,1 mm/min até que ocorresse a fratura do osso.

Figura 9. Conjunto preparado para o ensaio. A) A posição vertical do eixo longitudinal do fêmur foi obtida por comparação com um fio de prumo (seta). B) Conjunto acrílico-osso posicionado para o ensaio, com o pino de 2,0 mm de diâmetro colocado sobre a cabeça do fêmur.

Dos ensaios foram obtidos gráficos força x deformação de onde foi possível calcular as propriedades mecânicas força máxima e rigidez (Figura 10).

Figura 10. Gráfico representativo da força x deformação obtido do ensaio mecânico do terço proximal do fêmur. Destaque para as propriedades mecânicas obtidas: força máxima e rigidez.

2.5.4 Análise estatística

Os dados entre os grupos foram comparados entre si pela análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa foi utilizado o teste *post hoc* de Bonferroni, com nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa estatístico SPSS® (*Statistical Package for Social Science*) SCUE versão 14.0.

3 RESULTADOS

Dos doze animais por grupo, alguns foram excluídos em virtude de morte durante o curso do experimento, peso final muito abaixo da média (menor que um desvio-padrão), comportamento mecânico muito diferente em relação aos outros animais do grupo e incapacidade de leitura na densidade óssea por posicionamento inadequado do fêmur (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das perdas de animais por grupo

	C	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
Morte por causa desconhecida	01			01	01	
Baixo peso final		01		01	01	02
Comportamento mecânico esdrúxulo	01	01	01	01	02	01
Incapacidade de leitura da densidade óssea			01		01	
Total excluído	02	02	02	03	05	03
Total analisado	10	10	10	09	07	09

3.1 Mensurações macroscópicas

3.1.1 Massa corporal

Os valores da massa corporal final dos animais dos grupos experimentais estão apresentados no APÊNDICE A (Tabela A₁). O valor médio da massa corporal final dos animais do grupo **C** foi 324 ± 23 g, do grupo **ALN/D** foi 330 ± 22 g, do grupo **ALN/S** foi 325 ± 21 g, do grupo **I** foi 266 ± 16 g, do grupo **I+ALN/D** foi 253 ± 21 g e do grupo **I+ALN/S** foi 262 ± 80 g (Figura 11).

Figura 11. Valores médios da massa corporal final nos diferentes grupos e sua representação estatística:

- * Estatisticamente menor que o grupo C;
- ** Estatisticamente menor que o grupo ALN/D;
- *** Estatisticamente menor que o grupo ALN/S.

1. Comparações entre todos os grupos

Com relação à massa corporal final dos animais houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$), com o teste *post hoc* de Bonferroni os grupos **I**, **I+ALN/D** e **I+ALN/S** apresentaram médias significativamente inferiores aos grupos **C**, **ALN/D** e **ALN/S** ($p < 0,001$ para todos).

$$(I = I+ALN/D = I+ALN/S) < (ALN/S = C = ALN/D)$$

2. Comparação entre o grupo controle e os tratados sem imobilização

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,81$).

$$(C = ALN/D = ALN/S)$$

3. Comparação entre os grupos imobilizados

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imobilizados ($p = 0,27$).

$$(I = I+ALN/D = I+ALN/S)$$

3.1.2 Massa do fêmur

Os valores da massa do fêmur dos animais dos grupos experimentais estão apresentados no APÊNDICE A (Tabela A₂). O valor médio da massa do fêmur direito nos animais do grupo **C** foi $1,01 \pm 0,13$ g, no grupo **ALN/D** foi $1,10 \pm 0,08$ g, no grupo **ALN/S** foi $0,99 \pm 0,10$ g, no grupo **I** foi $0,86 \pm 0,11$ g, no grupo **I+ALN/D** foi $1,05 \pm 0,08$ g e no grupo **I+ALN/S** foi $1,00 \pm 0,08$ g (Figura 12).

Figura 12. Valores médios da massa do fêmur nos diferentes grupos e sua representação estatística:

* Estatisticamente menor que o grupo C.

** Estatisticamente menor que o grupo ALN/D.

*** Estatisticamente menor que o grupo I+ALN/D.

1. Comparações entre todos os grupos

Para a massa do fêmur, houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$) no teste *post hoc* de Bonferroni o grupo **I** apresentou média significativamente inferior aos grupos **C**, **ALN/D**, **I+ALN/D** ($p = 0,03$, $p < 0,001$ e $p < 0,007$, respectivamente). Estes três últimos grupos foram estatisticamente iguais entre si. Os grupos **ALN/S** e **I+ALN/S** permaneceram em posições intermediárias, nem inferiores e nem superiores aos demais.

$$I < (C = ALN/D = I+ALN/D)$$

2. Comparação entre o grupo controle e os tratados sem imobilização

Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p = 0,06$).

$$(C = ALN/D = ALN/S)$$

3. Comparação entre os grupos imobilizados

Pelos resultados das médias dos grupos imobilizados houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,001$). Pelo teste *post hoc* de Bonferroni o grupo **I** apresentou média significativamente inferior aos grupos **I+ALN/D** ($p = 0,001$) e **I+ALN/S** ($p = 0,01$).

$$I < (I+ALN/D = I+ALN/S)$$

3.1.3 Comprimento do fêmur

Os valores do comprimento do fêmur dos animais dos grupos experimentais estão apresentados no APÊNDICE A (Tabela A₃). O valor médio do comprimento do fêmur dos animais no grupo **C** foi $36,1 \pm 1,3$ mm, no grupo **ALN/D** foi $36,3 \pm 0,4$ mm, no grupo **ALN/S** foi $35,7 \pm 1,2$ mm, no grupo **I** foi $34,5 \pm 1,0$ mm, no grupo **I+ALN/D** foi $34,8 \pm 1,5$ mm e no grupo **I+ALN/S** foi $35,0 \pm 1,8$ mm (Figura 13).

Figura 13. Valores médios do comprimento do fêmur nos diferentes grupos e sua representação estatística:

* Estatisticamente menor que o grupo ALN/D.

1. Comparações entre todos os grupos

Com relação ao comprimento do fêmur houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,01$). Pelo teste *post hoc* de Bonferroni o grupo I apresentou média significativamente inferior ao grupo **ALN/D** ($p = 0,04$).

$$I < \text{ALN/D}$$

2. Comparação entre o grupo controle e os tratados sem imobilização

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,52$).

$$(C = \text{ALN/D} = \text{ALN/S})$$

3. Comparação entre os grupos imobilizados

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,71$).

$$(I = I+\text{ALN/D} = I+\text{ALN/S})$$

3.2 Análise mecânica

3.2.1 Força máxima

Os valores da força máxima obtidos do ensaio mecânico da região do colo femoral dos animais dos grupos experimentais estão apresentados no APÊNDICE B (Tabela B₁). O valor médio da força máxima no terço proximal do fêmur dos animais no grupo **C** foi ($87,4 \pm 5,00$) N, o valor médio no grupo **ALN/D** foi ($111,50 \pm 11,94$) N, no grupo **ALN/S** foi ($103,10 \pm 15,8$) N, no grupo **I** foi ($56,30 \pm 16,6$) N, o valor médio no grupo **I+ALN/D** foi ($97,3 \pm 10,61$) N e no grupo **I+ALN/S** foi de ($83,30 \pm 7,3$) N (Figura 14).

Figura 14. Valores das médias da força máxima no ensaio de flexo-compressão dos fêmures nos diferentes grupos e sua representação estatística:

- * Estatisticamente maior que o grupo I;
- **Estatisticamente maior que o grupo I+ALN/S;
- ***Estatisticamente maior que o grupo C.

1. Comparações entre todos os grupos

Na análise da variável força máxima houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Pelo teste *post hoc* de Bonferroni o grupo **I** apresentou média significativamente inferior aos demais grupos ($p < 0,001$). O grupo **I+ALN/S** apresentou média significativamente inferior a dos grupos **ALN/S** ($p = 0,01$) e **ALN/D** ($p < 0,001$), o grupo **C** apresentou média significativamente inferior ao do grupo **ALN/D** ($p < 0,001$).

I < todos

(I+ALN/D = C = I+ALN/S)

I+ALN/S < (ALN/S = ALN/D) e C < ALN/D

2. Comparação entre o grupo controle e os tratados sem imobilização

Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que o grupo **C** teve média significativamente inferior a dos grupos **ALN/D** e **ALN/S** ($p < 0,001$ e $p = 0,02$, respectivamente).

C < (ALN/D = ALN/S)

3. Comparação entre os grupos imobilizados

Houve diferença significativa entre os grupos imobilizados ($p < 0,001$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que o grupo **I** apresentou média significativamente inferior aos grupos imobilizados ($p < 0,001$).

I < (I+ALN/D = I+ALN/S)

3.2.2 Rigidez

Os valores da rigidez da região do colo femoral obtidos dos ensaios mecânicos dos animais dos grupos experimentais estão apresentados no APÊNDICE B (Tabela B₂). O valor médio da rigidez do terço proximal do fêmur dos animais no grupo **C** foi $(179,2 \pm 38,94) \times 10^3$ N/m, o valor médio no grupo **ALN/D** foi $(188,3 \pm 35,20) \times 10^3$ N/m, no grupo **ALN/S** foi $(153,6 \pm 35,22) \times 10^3$ N/m, no grupo **I** foi $(145,4 \pm 29,7) \times 10^3$ N/m, o valor médio da rigidez femoral no grupo **I+ALN/D** foi $(197,53 \pm 20,6) \times 10^3$ N/m e no grupo **I+ALN/S** foi $(160,81 \pm 31,12) \times 10^3$ N/m (Figura 15).

Figura 15 Valores das medidas da rigidez femoral nos grupos e suas representações estatísticas:

* Estatisticamente maior que o grupo I.

1. Comparações entre todos os grupos

Houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,01$). No teste *post hoc* de Bonferroni o grupo **I** apresentou média significativamente inferior ao grupo **I+ALN/D** ($p = 0,04$).

$$\mathbf{I} < \mathbf{I+ALN/D}$$

2. Comparação entre o grupo controle e os tratados sem imobilização

Não houve diferença significativa ($p = 0,11$).

$$\mathbf{C} = \mathbf{ALN/D} = \mathbf{ALN/S}$$

3. Comparação entre os grupos imobilizados

Houve diferença significativa ($p = 0,004$). No teste *post hoc* de Bonferroni o grupo **I+ALN/D** apresentou média significativamente superior a dos grupos **I** ($p = 0,004$) e **I+ALN/S** ($p = 0,04$).

$$\mathbf{I+ALN/D} > (\mathbf{I} = \mathbf{I+ALN/S})$$

3.3 Análise da densidade óssea

Os valores da densidade óssea do colo femoral dos animais dos grupos experimentais estão apresentados no APÊNDICE C (Tabela C). Os valores descritos na Tabela 2 e apresentados no gráfico da Figura 16, representam a média da densidade, em milímetros de alumínio (mmAl), da região do colo femoral.

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão da densidade óssea obtida da análise realizada no colo femoral do membro imobilizado.

GRUPOS	Colo femoral (mmAl)
C	1,50 $\pm$ 0,16
ALN/D	1,48 $\pm$ 0,10
ALN/S	1,56 $\pm$ 0,26
I	1,21 $\pm$ 0,27
I+ALN/D	1,50 $\pm$ 0,10
I+ALN/S	1,34 $\pm$ 0,26

Figura 16. Média dos valores da densidade óssea no colo femoral do membro imobilizado e sua representação estatística:

* Estatisticamente menor que o grupo C;

** Estatisticamente menor que o grupo ALN/S.

1. Comparação entre todos os grupos

Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,006$). Pelo teste *post hoc* de Bonferroni o grupo I apresentou média significativamente inferior aos grupos C e ALN/S ($p = 0,04$ e $p = 0,006$, respectivamente).

I < (C = ALN/S)

2. Comparação entre o grupo controle e os tratados sem imobilização

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,59$).

C = ALN/D = ALN/S

3. Comparação entre os grupos imobilizados

Não houve diferença significativa para a densidade óssea dos grupos imobilizados ($p = 0,068$). Podemos descrever uma forte tendência de diferença significativa entre **I** e **I+ALN/D**.

$$\mathbf{I = I+ALN/D = I+ALN/S}$$

3.3.1 Correlação entre densidade óssea e força máxima

A correlação entre a força máxima e a densidade óssea de todos os animais dos grupos foi crescente e teve como equação a reta $y = 44,86x + 25,72$ (Figura 17).

Figura 17. Correlação entre a força máxima e a densidade óssea de todos os animais dos grupos.

3.3.2 Correlação entre densidade óssea e rigidez

A correlação entre a rigidez e a densidade óssea de todos os animais dos grupos foi crescente e teve como equação a reta $y = 33,94x + 121,24$ (Figura 18).

Figura 18. Correlação entre a rigidez e a densidade óssea de todos os animais dos grupos

4 DISCUSSÃO

O tecido ósseo desempenha funções estruturais e metabólicas no organismo. Sua solidez característica provém de um entremeado de células diferenciadas e estruturadas com matriz de colágeno e minerais, o que o diferencia de outros tecidos.

Os ossos, em condições saudáveis, suportam esforços mecânicos representados pelo peso corporal, contrações musculares, tensões externas e a ação do meio ambiente. Quando um determinado membro não é utilizado por um período longo há diminuição das solicitações mecânicas habituais, o que leva a um processo de adaptação caracterizado por reabsorção óssea que, se excessivo, causa enfraquecimento, chamado osteopenia da hipoatividade.

O desuso pode ser secundário a causas específicas como doenças neurológicas associadas a deficiência motora como a paralisia cerebral, seqüela de acidente vascular cerebral, traumatismo crânioencefálico e lesões medulares, e evolui, com frequência, para atrofia musculares e ósseas pelo desuso.

Por outro lado, a imobilização, que é utilizada como tratamento desde a pré-história, em algumas situações pode permanecer por meses, leva à diminuição da massa óssea e também interfere no metabolismo do cálcio. É descrita como uma causa de hipercalcemia pela aceleração da reabsorção óssea pelos osteoclastos, de forma que a quantidade de cálcio sangüíneo excede a capacidade excretora do rim (AKKARI; SANTILI, 2003).

A imobilização torna-se crítica quando é associada a uma condição patológica de base de natureza osteopênica como o raquitismo e a osteogênese imperfeita.

O tratamento preventivo com reabilitação, muitas vezes, não é suficiente para prevenir as alterações provocadas pelas imobilizações. Assim, tem sido tentado o uso de substâncias que atuam positivamente sobre a estrutura óssea como o cálcio (KE et al., 2005), calcitonina (JIANG et al., 2005), hormônios esteróides (PAZ et al., 2001) e bisfosfonatos (LEBLANC et al., 2002; MORRIS; EINHORN, 2005).

O alendronato é um bisfosfonatos utilizado para o tratamento da osteoporose e sua efetividade já foi descrita por diversos autores (BATCH et al., 2003; FLEISCH, 2003; ITO et al., 2002; HUUSKONEN et al., 2001; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991). Porém, poucos trabalhos investigaram a efetividade do alendronato para combater a osteopenia secundária à imobilização e imobilidade. Encontramos o trabalho de Mosekilde et al. (2000) que compararam o efeito do risedronato ao alendronato, na prevenção da perda óssea causada pela imobilização em ratas e Leblanc et al. (2002) que, após submeter voluntários humanos à restrição em leito por 17 semanas, comprovaram aumento na densidade óssea da região da coluna lombar, pelve, colo femoral e calcâneo, com o uso de alendronato.

Nesta investigação, estudamos algumas propriedades de resistência mecânica e densidade óssea na osteopenia causada pela imobilização gessada em ratas, associadas ou não ao alendronato de sódio.

Ratas da raça *Wistar* foram os animais escolhidos neste estudo, pois são animais de baixo custo, fácil manuseio e adaptam-se às condições adversas causadas pela imobilização. Mesmo assim, nossos resultados mostram que a imobilização utilizada causou repercussões, levando à exclusão de quatro animais por baixo peso. Segundo Ergermann, Goldhahn e Schneider (2005) e Mosekilde

(1995) o rato é considerado animal ideal para análise óssea e pesquisas em osteopenia, pois tem osso esponjoso com características de remodelação semelhantes aos vistos no osso esponjoso humano, além da anatomia óssea apresentar semelhanças à do esqueleto humano (como no terço proximal do fêmur), embora seja um animal quadrúpede.

Optamos pela seleção dos animais pela massa corporal pela maior facilidade de controle, como escolhido em vários trabalhos pesquisados (ASTRAND; ASPENBERG, 2002; CARVALHO; SHIMANO; VOLPON, 2002; MILLETT; ALLEN; BOSTROM, 2002; SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991).

A utilização de animais adulto-jovens assegura maior sobrevivência e não interfere na produção da osteopenia (GUY et al., 1993; ITO et al., 2002; PAZ et al., 2001).

A massa final dos animais do grupo controle (**C**) e naqueles tratados sem imobilização (**ALN/D** e **ALN/S**) representou diferença significativa, quando comparado com o grupo imobilizado (**I**) e os imobilizados e tratados (**I+ALN/S** e **I+ALN/D**), resultados também encontrados por Mosekilde et al. (2000). A perda de peso com a imobilização sugere repercussão importante na vida do animal, provavelmente por diminuição da ingesta, seja por alguma dificuldade em acessar a ração ou pelo estresse representado pelo aparelho gessado, ou mesmo, todas as alternativas caracterizando causa multifatorial, embora Hoot et al. (2003) tenham imobilizado o membro pélvico de ratos durante dez dias e constataram que apenas no primeiro dia houve diminuição no consumo de ração, sem acarretar perda final de peso. Entretanto, o tempo de imobilização usado em nossa investigação foi relativamente longo.

Trabalho científico recente em humanos constatou diminuição de densidade mineral óssea em período de tempo pequeno associada à perda de massa corporal após cirurgia bariátrica e demonstrou que a perda tem uma causa múltifatorial e não apenas a diminuição da ingesta alimentar (PEREIRA et al, 2007). Desta forma, poderíamos caracterizar uma hipótese como causa múltifatorial a diminuição de massa corporal nos animais analisados.

Optamos pela imobilização gessada com o objetivo de obter osteopenia de forma rápida, reversível e com menores riscos para os animais em relação aos modelos que empregam técnicas cirúrgicas. Castro (2000) cita que a imobilização permanente ou temporária, raramente causa osteopenia. Nossos resultados são contrários, pelas mensurações macroscópicas, resultados de resistência mecânica e de densitometria óssea no grupo imobilizado.

A dose de alendronato e via de administração foram baseadas nas referências de Bushinsky et al. (1999), Millett, Allen e Bostrom (2002) e Paz et al. (2001). Foi selecionada a via de administração subcutânea na região dorsal do animal por ser de fácil acesso, rápida absorção e maior segurança na quantidade da dosagem recebida. Foi optado pela utilização de mais de uma dosagem para investigar a influência causada pela periodicidade e quantidade de medicação nos animais (SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991).

Vários trabalhos descreveram os efeitos colaterais da administração de alendronato por via oral (GUY et al., 1993; LEBLANC et al., 2002; PETER; KINDT; MAJKA, 1998; PORRAS; HOLAND; GERTZ, 1999), inclusive com morte de animais em virtude de afecções gastroesofágicas. Além disso, esta via de administração requer jejum, horários diferenciados de dosagem e alimentação ulterior como realizado por Mondelo et al. (1997). Este autor manteve os animais em jejum por

nove horas antes e duas horas após medicação pela sonda nasogástrica, pois o alendronato só é absorvido em situações de acidez (McHUGH et al., 2002). Além disso, por esta via, não há certeza de que a dose oferecida seja totalmente absorvida, sem regurgitação. Entretanto, apesar de apoiada em literatura, a dosagem usada em nosso experimento, comparada com a dose de equivalência humana semanal de alendronato (0,01 mg/kg/semana por Millett, Allen, Bostrom (2002) e Peter e Rodan (1999)) foi superior. Assim, seria interessante usar esta última dosagem em ratas para comparação mais direta com as situações clínicas médicas.

Com relação à massa femoral, o exame dos histogramas da figura 12 mostra claramente que a imobilização causou diminuição da massa do fêmur e que o alendronato foi capaz de prevenir esta alteração. Estes resultados são corroborados pelos dados de medida do comprimento do fêmur (figura 13), embora de maneira menos evidente. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Grynpas et al. (1995).

Em nossos resultados, as repercussões tanto da imobilização, quanto do uso do alendronato de sódio, foram mais nítidos sobre a massa óssea do que sobre o crescimento do fêmur, o que poderia ser explicado pelo fato dos animais já estarem em fase adiantada de crescimento. Achamos interessante como sugestão para futuros trabalhos o mesmo estudo em ratas mais jovens.

No ensaio mecânico, a força de compressão aplicada na cabeça femoral teve direção vertical e como se apresenta distante do eixo longitudinal do fêmur os esforços que atingem a região do colo do femoral são de flexo-compressão, portanto, simulando o que acontece na espécie humana. A semelhança com a fratura no indivíduo com osso osteopênico pode ser sugerida, mas no homem a

fratura acontece por influência de forças combinadas em situações diversas e ainda pouco conhecidas, diferentemente das forças controladas utilizadas nos ensaios.

Uma preocupação metodológica deste trabalho foi a padronização da aplicação de forças no ensaio de flexo-compressão do terço proximal femoral. Para tanto, realizamos uma adaptação no método idealizado por Castro (2006)³, em comunicação pessoal, onde incluímos o segmento distal do fêmur em uma base de cimento acrílico de formato esférico que possibilitaria o livre posicionamento do osso até atingir a posição vertical e prendê-lo adequadamente com a morsa.

Os resultados da análise da força máxima no ensaio mecânico do colo femoral entre os grupos imobilizados e tratados (**I+ALN/S** e **I+ALN/D**) apresentaram diferença significativa, quando comparados com o grupo imobilizado (**I**). Portanto, o alendronato beneficiou os animais tratados, o que está de acordo com dados relatados por outros autores (MOSEKILDE et al., 2000; PETER; RODAN, 1999). Também, foram encontrados resultados semelhantes em trabalhos que utilizaram ensaio mecânico de compressão da diáfise femoral (GUY et al., 1993; HUUSKONEN et al., 2001; ITO et al., 2002; MOSEKILDE et al., 2000).

As análises do grupo controle (**C**) com a variável força máxima e os tratados sem imobilização (**ALN/D** e **ALN/S**) revelaram diferenças significativas o que leva à conclusão de que o alendronato aumentou a resistência do osso normal, resultados também observados por Guy et al. (1993). O aumento de valores da força máxima na análise de propriedades mecânicas para grupos tratados e sem imobilização também foi observado por autores que utilizaram pamidronato (GRYNPAS et al., 1995; MONDELO et al., 1997) e risedronato de sódio (OLIVEIRA et al., 2004).

³ Informação fornecida por Castro, D.A., em Ribeirão Preto, em 2006.

A comparação entre todos os grupos estudados mostrou diminuição significativa da rigidez femoral no grupo imobilizado (I). A rigidez é uma propriedade estrutural e, quanto maior, maior será a força necessária para a deformação do conjunto (SOUZA, 1982). Verificamos que o tratamento causou efeitos benéficos na prevenção do enfraquecimento da estrutura óssea submetida à imobilização.

Os resultados da densidade óssea do colo femoral mostram diferença significativa entre os grupos. A representação gráfica apresentou resultados correspondentes aos obtidos com resistência mecânica e, como em outros trabalhos (CLEMENT et al., 2002; GUY et al., 1993; MOSEKILDE et al., 2000), a densidade da região foi utilizada como uma confirmação do método de imobilização e do tratamento instituído.

A análise de densidade óssea em imagem radiográfica também conhecida como densitometria óptica radiográfica (LOUZADA; FERREIRA; NOGUEIRA, 2001) possibilita avaliação de cada imagem e a atribuição de valores quantitativos para cada espécime, além do que, representa uma análise de custo baixo e fácil reprodutividade em meio laboratorial (LOUZADA; FERREIRA; NOGUEIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; WATANABE et al., 2006).

Com a correlação entre as propriedades mecânicas (força máxima e rigidez) e a densidade óssea obtivemos uma reta crescente, mostrando que o efeito da medicação foi benéfico, aumentando a resistência óssea de forma diretamente proporcional às grandezas mecânicas analisadas.

É importante ressaltar que nossos resultados mostraram a eficácia do alendronato como medicação preventiva, pois o início da medicação foi concomitante à imobilização nos grupos imobilizados e tratados.

O aumento da resistência à fratura é uma comprovação da qualidade óssea propiciada pelo alendronato. Esta qualidade favorece um paciente em uma situação de osteopenia por desuso ou em estado de imobilidade e pode prevenir fraturas.

Na literatura, a osteopenia secundária à imobilização é proporcional ao tempo de imobilização (LEBLANC et al., 2002), mas resultados conflitantes são observados quanto ao período e idade cronológica (BIKLE; SAKATA; HALLORAN, 2003; LEBLANC et al., 2002; MOSEKILDE et al., 2000). Em nosso estudo ratos adulto-jovens imobilizados apresentaram osteopenia secundária à imobilização e a prevenção ocorreu em períodos semelhantes nos imobilizados e tratados.

A estrutura de um osso será mais resistente, melhor ou mais forte se submetido a estímulos e solicitações de uma vida saudável, com boa alimentação e principalmente se associada à prática física. Porém, em muitas situações clínicas, quando imobilizado e osteopênico, o osso não será estimulado da mesma forma e haverá riscos que precisarão ser prevenidos até que ocorra seu restabelecimento. Como demonstrado com este estudo, a utilização de substância que atue nesta proteção pode ser útil na reabilitação.

Os resultados de um estudo experimental devem ser analisados de maneira consciente; o rato é um animal quadrúpede e com características de ordem evolutivas diferentes dos humanos. Mesmo entre indivíduos de mesma espécie ocorrem grandes variações fenotípicas que seriam inviáveis a extrapolação completa de dados para todos os indivíduos de uma dada espécie. O ideal é que a análise de resultados de um trabalho experimental seja um estímulo para novas investigações e pesquisas na área.

Sugerimos, para pesquisas futuras, a utilização de alendronato de sódio em dosagem semanal de equivalência humana em ratos imobilizados ou não; a

utilização de corpos vertebrais de ratos para estudo; avaliações pela histomorfometria óssea e avaliações em diferentes idades de crescimento.

5 CONCLUSÕES

1. O alendronato de sódio foi capaz de prevenir o enfraquecimento causado pela imobilização gessada no fêmur de ratas jovens.

2. O alendronato de sódio aumentou a resistência mecânica de fêmures de animais normais e não imobilizados.

3. Houve uma correlação positiva e linear entre a força máxima e a rigidez com a densidade óptica radiográfica, que caracterizou o efeito benéfico do alendronato na osteopenia induzida por imobilização.

Referências⁴

AKKARI, M.; SANTILI, C. Metabolismo do cálcio e do fósforo. In: PARDINI JUNIOR, A. G. & SOUZA, J. M. G. **Clínica Ortopédica Doenças Osteometabólicas**. Rio de Janeiro: Medsi, v.4 (2), p.253-259, 2003.

ANDERSSON, N.; SURVE, V. V.; LEHTO-AXTELIUS, D.; OHLSSON, C.; HAKANSON, R.; ANDERSSON, K.; RYBERG, B. Drug-induced prevention of gastrectomy and ovariectomy-induced osteopaenia in the young female rat. **The Journal of Endocrinology**, London, v.175, p.695-703, 2002.

ASTRAND, J.; ASPENBERG, P. Systemic alendronate prevents resorption of necrotic bone during revascularization. A bone chamber study in rats. **BMC Musculoskeletal Disorders**, London, v.3, p.19, 2002.

BARON, R. D. D. S. Anatomy and ultrastructure of bone. In Favus M J (ed.) **Primier on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1993, p.3-10.

BATCH, J. A.; COUPER, J. J.; RODDA, C.; COWELL, C. T.; ZACHARIN, M. Use of bisphosphonate therapy for osteoporosis in childhood and adolescence. **Journal of Paediatrics and Child Health**, Melbourne, v.39, p.88-92, 2003.

BIKLE, D. D.; SAKATA, T.; HALLORAN, B. P. The impact of skeletal unloading on bone formation. **American Society for Gravitational and Space Biology Bulletin**, Alexandria, v.16 (2), p.45-54, 2003.

BRIGHTON, C. T.; KATZ, M. J.; GROLL, S. R.; NICHOLS, C. E.; POLLACK, S. R. Prevention and treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat tibia with capacitively coupled electrical stimulation. **Bone**, New York, v.6, p.87-97, 1985.

BUSHINSKY, D. A.; NEUMANN, K. J.; ASPLIN, J.; KRIEGER, N. S. Alendronate decreases urine calcium and supersaturation in genetic hypercalciuric rats. **Kidney International**, New York, v.55, p.234-243, 1999.

⁴ Normas de acordo com as **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso** – São Paulo – 2004.

CARVALHO, C. M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, Rio de Janeiro, v.18 (2), p.65-73, 2002.

CARVALHO, D. C. L.; CLIQUET, A. Low intensity ultrasound effects over osteopenic female rat bones. **Acta Ortopedica Brasileira**, São Paulo, v.11(1), p.17-24, 2003.

CASTRO, C. H. M. Modelos animais em osteoporose. In: Szejnfeld, V. L. **Osteoporose: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000, p.46-53.

CAVANAGH, P. R.; LICATA, A. A.; RICE, A. J. Exercise and pharmacological countermeasures for bone loss during long-duration space flight. **American Society for Gravitational and Space Biology Bulletin**, Alexandria, v.18 (2), p.39-58, 2005.

CLEMENT, E. V. D. P. et al. Alendronate in the prevention of bone loss after a fracture of the lower leg. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.17 (12), p.2247-2255, 2002.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.35, p.1329-1332, 2002.

EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis International**, London, v.16, p.S129-S138, 2005.

FERRETTI, J. L.; COINTRY, G. R.; CAPOZZA, R. F.; MONDELO, N.; PELUFFO, V.; CHIAPPE, A.; META, M.; ALIPPI, R. M. Efectos de los bifosfonatos sobre la eficiencia mecanica de esqueletos normales u osteopenicos. **Medicina: Buenos Aires**, Buenos Aires, (Supl I), p.83-92, 1997.

FLEISCH, H. Bisphosphonates - history and experimental basis. **Bone**, New York, v. 8 (Suppl I), p.S23-S28, 1987.

FLEISCH, H. Bisphosphonates in osteoporosis. **European Spine Journal**, Heidelberg, v.12 (Suppl II), p.S142-S146, 2003.

GIARDINO, R.; FINI, M.; NICOLI, A. N.; GNUDI, S.; BIAGINI, G.; GANDOLFI, M. G.; MONGIORGI, R. Effects of synthectic salmon calcitonin and alendronate on bone quality in ovariectomized rats. **Minerva Medica**, Torino, v.88 (11), p.469-477, 1997.

GRYNPAS, M. D.; KASRA, M.; RENLUND, R.; PRITZKER, P. H. The effect of pamidronate in a new model of immobilization in the dog. **Bone**, New York, v.17 (4), (Suppl II), p.225S-232S, 1995.

GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L. G. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.39 (9), p.477-485, 2004.

GUY, J. A.; SHEA, M.; PETER, C. P.; MORRISSEY, R.; HAYES, W. C. Continuous alendronate treatment throughout growth, maturation, and aging in the rat results in increases in bone mass and mechanical properties. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.53, p.283-288, 1993.

HAYES, W. C.; SHEA, M.; RODAN, G. A. Preclinical evidence of normal bone with alendronate. **International Journal of Clinical Practice**, Esher, (Suppl) April, p.09-13, 1999.

HORNBY, S. B.; FORD, S. L.; TIMPSON, N. J. et. al Skeletal changes in the ewe after ovariectomy. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.9 (Suppl 1) p.S258, 1994.

HOTT, M.; DELOFFRE, P.; TSOUDEROS, Y.; MARIE, P. J. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. **Bone**, New York, v.33, p.115-123, 2003.

HUUSKONEN, J.; ARNALA, I.; OLKKONEN, H.; ALHAVA, E. Alendronate influences bending force of femoral diaphysis after orchidectomy in rats. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae**, Helsinki, v.90 (2), p.109-114, 2001.

ITO, M.; AZUMA, Y.; TAKAGI, H.; KOMORIYA, K.; OHTA, T.; KAWAGUCHI, H. Curative effect of combined treatment with alendronate and 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on bone loss by ovariectomy in aged rats. **Japan Journal of Pharmacology**, Kyoto, v.89 (3), p.255-266, 2002.

JIANG, Y.; ZHAO, J.; GEUSENS, P.; LIAO, E. Y. et al. Femoral neck trabecular microstructure in ovariectomized ewes treated with calcitonin: MRI microscopic evaluation. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.20 (1), p.125-130, 2005.

JOHNSTON, C. C.; KANS, J. A.; MELTON, L. J.; CHRISTIANSEN, C.; KHALTAER, N. The diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.9, p.1137-1141, 1994.

JOZSA, L.; REFFY, A.; JARVINEN, M.; KANNUS, P.; LETHO, M.; KVIST, M. Cortical and trabecular osteopenia after immobilization. A quantitative histological study of the rat knee. **International Orthopaedics**, Berlin, v.12, p.169-172, 1988.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KE, H. Z.; QI, H.; CRAWFORD, D. T.; SIMMONS, H. A.; XU, G. et al. A new vitamin D analog, 2MD, restores trabecular and cortical bone mass and strength in ovariectomized rats with established osteopenia. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.20 (10), p.1742-1755, 2005.

KE, H. Z.; CRAWFORD, D. T.; QI, H.; SIMMONS, H. A.; OWEN, T. A. et al. A nonprostanoid EP4 receptor selective prostaglandin E2 agonist restores bone mass and strength in aged, ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.21 (4), p.565-575, 2006.

KUROKOUCHI, K.; ITO, T.; OHMORI, S.; KANDA, K.; MURATA, Y.; IZUMI, R.; INAZU, M.; IWATA, H. Effects of bisphosphonate on bone metabolism in tail-suspended rats. **Environmental Medicine**, Nagoya, v.40 (1), p.39-42, 1996.

KUROKOUCHI, K.; ITO, T.; OHMORI, S.; KANDA, K.; MURATA, Y.; YASUKAWA, K.; IZUMI, R.; INAZU, M.; IWATA, H.; SEO, H. Administration of bisphosphonate prevents disuse bone atrophy induced by tail suspension. **Environmental Medicine**, Nagoya, v.41 (1), p.16-17, 1997.

LEBLANC, A. D. et al. Alendronate as an effective countermeasure to disuse induced bone loss. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, Kifissia, v.2 (4), p.335-343, 2002.

LENTLE, R. G.; KRUGER, M. C. Changes in mineralization and biomechanics of tibial metaphyses in splinted rats. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.99, p.173-180, 2005.

LOUZADA, M. J. Q.; FERREIRA, D. L.; NOGUEIRA, G. P. Avaliação de densidade óssea em fêmures de ratos tratados com cafeína. In: Congresso Brasileiro de Biomecânica, 9, 2001, Gramado, **Anais IX Congresso Brasileiro de Biomecânica**, Gramado: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001, v.II, p.342-347.

MARCUS, R. Fármacos que afetam a calcificação e a renovação óssea In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^a edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, p.1291-1311.

McHUGH, N. A.; VERCESI, H. M.; EGAN, R. W.; HEY, J. A. In vivo rat assay: bone remodeling and steroid effects on juvenile bone by pQCT quantification in 7 days, **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.284, p.E70-E75, 2003.

MILLER, S. C.; BOWMAN, B. M.; JEE, W. S. S. Available animal models of osteopenia –small and large. **Bone**, New York, v.17 (4) Suppl, p.117S-123S, 1995.

MILLETT, P. J.; ALLEN, M. J.; BOSTROM, M. P. G. Effects of Alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, Boston, v.84A (2), p.236-249, 2002.

MONDELO, N.; PARMA, M. D.; PELUFFO, V. A.; ZANCHETTA, J. R.; PICCINNI, E.; MONTUORI, E. Efectos experimentales de olpadronato y pamidronato sobre la masa ósea. **Medicina (Buenos Aires)**, Buenos Aires, v.57 (Supl I), p.17-24, 1997.

MOSEKILDE, L. Assessing bone quality–animal models in preclinical osteoporosis research. **Bone**, New York, v.17 (4), Suppl, p.343S-352S, 1995.

MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J. S.; MACKEY, M. S.; PHIPPS, R. J. Treatment with risedronate or alendronate prevents hind-limb immobilization-induced loss of bone density and strength in adult female rats. **Bone**, New York, v.27 (5), p.639-645, 2000.

MORRIS, C. D.; EINHORN, T. A. Bisphosphonate in orthopaedic surgery. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, Boston, v.87, p.1609-1618, 2005.

NASH, W. A. **Resistência dos Materiais**: Coleção Schaum. Tradução Jaime Ferreira da Silva. São Paulo: Mcgraw-Hill do Brasil Ltda.,1977, p.11-20.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL "**Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**". Washington: National Academy Press, 1996.

OLIVEIRA, L. G.; GUIMARÃES, M. L. R. Tecido Ósseo - estrutura e função. In: PARDINI JUNIOR, A. G. & SOUZA, J. M. G. **Clínica Ortopédica Doenças Osteometabólicas**. Rio de Janeiro: Medsi, v.4 (2), p.243-251, 2003.

OLIVEIRA, L. A. A.; GUARNIERO, R.; RODRIGUES, C. J.; SANTANA, P. J.; BATISTA, M. A. Avaliação do efeito do risedronato sódico na consolidação de fraturas: estudo experimental em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.12 (2), p.77-83, 2004.

OLIVEIRA, M. T. M.; MACEDO, L. D.; BEL, E. A.; WATANABE, P.C.A.; ALBUQUERQUE, R. F. Avaliação da densitometria óssea de tecidos ósseos neoformados após distração osteogênica mandibulares. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, Maringá, v.11 (1), p.37-43, 2006.

PAZ, L. H. B. C.; FALCO, V.; TENG, N. C.; REIS, L. M.; PEREIRA, R. M. R.; JORGETTI, V. Effect of 17 β -estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.34, p.1015-1022, 2001.

PEREIRA, F. A.; CASTRO, J. A. S.; SANTOS, J. E.; FOSS, M. C.; PAULA, F. J. A. Impact of marked weight loss induced by bariatric surgery on bone mineral density and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40 (4), p.509-517, 2007.

PETER, C. P.; KINDT, M. V.; MAJKA, J. A. Comparative study of potential for bisphosphonates to damage gastric mucosa of rats. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.43 (5) p.1009-1015, 1998.

PETER, C.; RODAN, G. A. Preclinical safety profile of alendronate. **International Journal of Clinical Practice**, Oxford, (Supl April) p.3-8, 1999.

PRITCHARD, J. J. General anatomy and histology of bone. In: BOURNE, G. H. **The Biochemistry and Physiology of Bone**. New York: Academic Press, p.1-25, 1956.

PORRAS, A. G.; HOLLAND, S. D.; GERTZ, B. J. Pharmacokinetics of alendronate. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v.36 (5), p.315-328, 1999.

SEEDOR, J. G.; QUARTUCCIO, H. A.; THOMPSON, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.6 (4), p.339-346, 1991.

SIETSEMA, W. K. Animal models of cortical porosity. **Bone**, New York, v.17 (4) (Supl) p.297S-305S, 1995.

SOUZA, S. A. **Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1982.

SRIVASTAVA, T.; ALON, U. S. The role of bisphosphonates in diseases of childhood. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v.162, p.735-751, 2003.

STEDMAN, T. L. In: **STEDMAN DICIONÁRIO MÉDICO**, Tradução Sergio Augusto Teixeira, 23ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987, p.977.

SZEJNFELD, V. L. BIFOSFONATOS In:_____. **Osteoporose**: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier, 2000, p.353-366.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, New York, v.17 (4) (Supl), p.125S-133S, 1995.

YAMAMOTO, M.; MARKATOS, A.; SEEDOR, J. G.; MASARACHIA, P.; GENTILE, M.; RODAN, G. A.; BALENA, R. The effects of aminobiphosphonate alendronate on thyroid Hormone-induced osteopenia in rats. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.53, p.278-282, 1993.

VOLPON, J. B. A marcação do osso com substâncias fluorescentes. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.20 (5), p. 207-210, 1985.

WATANABE, P. A. C.; MONTEIRO, S. A. C.; CAMPBELL, J. C. T.; ELEJALDE, D. A. Analisis del patrón ósea trabecular de mandíbulas maceradas em radiografias panorâmicas digitais. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, v.24 (3), p.369-376, 2006.

WOOLF, A. D.; DIXON, A. St. J. In: **Osteoporose**: um guia clínico. London: Martin Dunitz, 1988, p.01-19.

ZHAO, J.; JIANG, Y.; GENANT, H. K. Preclinical studies of alendronate. **Journal of Musculoskeletal Research**, Singapore, v.3 (3), p.209-216, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas A₁, A₂ e A₃ – Mensurações macroscópicas dos animais.

APÊNDICE B – Tabelas B₁ e B₂ – Propriedades mecânicas obtidas do ensaio mecânico de flexo-compressão realizado no fêmur.

APÊNDICE C – Tabela C – Densidade óssea do colo femoral.

APÊNDICE A – Tabelas A₁, A₂ e A₃– Mensurações macroscópicas dos animais.**Tabela A₁ – Massa corporal dos animais.**

Animal	Massa Corporal (g)					
	CONT	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
1	350	350		285	245	260
2	355		310		280	270
3	305	310	345	285		265
4	290	360	355	270		265
5	315	340	325	240	240	260
6	320	350		265	225	270
7	345	310	355	255	240	
8		305	310	245	265	260
9	300	310	305	280	275	245
10	315	350	320	265		265
11	345	315	295			
12			330			
Média	324,0	330,0	325,0	265,6	252,9	262,2
Desvio padrão	23,1	21,7	21,1	16,5	20,6	7,5

Tabela A₂ – Massa do fêmur dos animais.

Animal	Massa do fêmur (g)					
	CONT	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
1	1,17	1,18		0,94	1,01	1,08
2	1,24		1,01		1,16	1,05
3	0,95	1,07	1,09	0,84		0,86
4	0,91	1,05	1,11	0,83		0,98
5	1,06	1,11	0,98	0,96	1,15	1,10
6	1,04	1,03		0,76	1,07	1,10
7	1,02	1,14	1,08	0,99	1,00	
8		1,12	0,88	0,99	0,98	0,94
9	0,89	1,13	0,86	0,70	1,00	0,93
10	0,81	1,24	0,94	0,76		0,99
11	1,03	0,94	0,85			
12			1,07			
Média	1,01	1,10	0,99	0,86	1,05	1,00
Desvio padrão	0,13	0,08	0,10	0,11	0,08	0,08

Tabela A₃ – Comprimento do fêmur dos animais.

Animal	Comprimento do fêmur (mm)					
	CONT	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
1	37,9	36,4		33,9	36,8	35,4
2	35,1		36,1		35,3	36,1
3	36,0	36,4	36,4	34,3		30,7
4	36,1	36,4	37,0	35,3		35,5
5	37,0	35,7	35,3	34,9	32,2	34,2
6	37,6	35,8		32,2	35,0	36,1
7	37,3	36,5	37,3	35,1	35,1	
8		36,2	32,9	35,1	33,6	36,0
9	35,1	36,1	35,5	35,1	35,8	35,9
10	34,5	37,0	35,5	34,4		35,4
11	34,6	36,1	36,0			
12			35,6			
Média	36,1	36,3	35,7	34,5	34,8	35,0
Desvio padrão	1,3	0,4	1,2	1,0	1,5	1,8

APÊNDICE B – Tabelas B₁ e B₂ – Propriedades mecânicas obtidas do ensaio mecânico de flexo-compressão realizado no fêmur.

Tabela B₁ – Força máxima obtida do ensaio mecânico no fêmur dos animais.

Animal	Força máxima (N)					
	CONT	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
1	80,5	123,4		88,5	92,9	79,1
2	95,9		112,4		100,3	78,2
3	85,8	117,1	112,5	52,4		90,2
4	81,2	108,3	116,3	43,3		69,3
5	91,9	106,7	128,9	76,5	114,8	87,6
6	89,6	104,3		56,3	97,0	79,0
7	89,6	109,3	92,7	42,0	101,2	
8		86,8	74,5	58,7	79,3	86,4
9	91,0	118,3	105,1	50,3	95,5	91,3
10	85,3	130,6	88,5	38,3		88,5
11	83,2	110,2	94,5			
12			105,2			
Média	87,4	111,5	103,1	56,3	97,3	83,3
Desvio padrão	5,0	11,9	15,8	16,6	10,6	7,3

Tabela B₂ – Rigidez obtida do ensaio mecânico no fêmur dos animais.

Animal	Rigidez (x10 ³ N/m))					
	CONT	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
1	112,9	212,6		170,5	195,2	142,3
2	244,1		110,7		197,2	179,8
3	208,8	179,9	162,6	106,3		112,5
4	214,1	169,2	114,3	123,7		132,2
5	155,3	190,0	176,5	182,5	186,5	149,6
6	140,8	153,7		164,0	189,7	167,9
7	186,0	189,9	205,6	104,5	168,6	
8		140,5	109,6	128,6	211,9	219,6
9	179,3	179,6	172,0	159,6	233,6	175,5
10	195,5	268,7	195,7	168,5		167,9
11	154,9	198,4	155,7			
12			133,2			
Média	179,2	188,3	153,6	145,4	197,5	160,8
Desvio padrão	38,9	35,2	35,2	29,7	20,6	31,1

APÊNDICE C – Tabela C – Densidade óssea do colo femoral.**Tabela C – Densidade óssea do colo femoral dos animais.**

Animal	Densidade óssea (mmAl)					
	CONT	ALN/D	ALN/S	I	I+ALN/D	I+ALN/S
1	1,86	1,62		1,65	1,52	1,47
2	1,57		1,38		1,47	1,33
3	1,45	1,40	1,25	0,91		1,33
4	1,58	1,40	1,87	0,98		1,05
5	1,25	1,58	1,31	1,43	1,69	1,18
6	1,48	1,46		1,31	1,49	0,92
7	1,53	1,60	1,36	1,08	1,49	
8		1,40	1,61	1,50	1,38	1,59
9	1,45	1,57	1,51	0,92	1,44	1,52
10	1,54	1,39	1,88	1,12		1,69
11	1,34	1,40	1,95			
12			1,52			
Média	1,50	1,48	1,56	1,21	1,50	1,34
Desvio padrão	0,16	0,10	0,26	0,27	0,10	0,26

ANEXOS

ANEXO A – Cópia do protocolo de aprovação do trabalho pela Comissão de Ética.

ANEXO B – Laudo do controle de qualidade da manipulação do Alendronato de Sódio Trihidratado.

ANEXO A – Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.1117.53.6), intitulado: "Análise das Propriedades Mecânicas de Ossos de Ratos Submetidos à Imobilização e Uso de Alendronato", de autoria de **Paulo Eugênio Santos Cecim**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 08.02.06

Ribeirão Preto, 10 de fevereiro de 2006

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretaria da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO B - Laudo do controle de qualidade da manipulação do alendronato de Sódio Trihidratado.

INJECTCENTER – Manipulação de Produtos Farmacêuticos Ltda - EPP
 Rua Florêncio de Abreu, 1114 – Centro – CEP 14015-060 – Fone/Fax: 16 3931-3280
 Ribeirão Preto – SP – CNPJ 05.231.934/0001-58 - Insc. Est. 582.629.589.119

LAUDO DE CONTROLE DE QUALIDADE

MATÉRIA-PRIMA: Alendronato de Sódio Trihidratado

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Fórmula Molecular	$C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$	De acordo
Peso Molecular	325,1	De acordo
Características	Pó cristalino branco ou quase branco	De acordo
Teor	98 a 102%	101%
pH	4,0 a 5,0	4,8
Solubilidade	Solúvel em água e pouco solúvel em álcool	De acordo

PRODUTO: ALENDRONATO DE SÓDIO 1% 10 ML Solução Injetável

Data de Fab.:24/05/04 Data de Val.:07/06/06

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aspecto	Solução aquosa, límpida de Alendronato de Sódio	De acordo
Teor	95 a 105%	102%
pH	5,0 a 7,0	6,2
Controle Microbiológico	N.H.C.*	De acordo
Material Particulado	Ausência	De acordo
Volume	10 mL	De acordo
Esterilidade	Solução estéril	De acordo
LAL (Endotoxina/Pirrogênio)	< 0,5 EU/mL	De acordo

* N.H.C. = não houve crescimento.

Referência da matéria-prima: Farmacopéia Portuguesa VII, 2002, p.766.

Dr. Marcelo Nobuo Sibata
 CRF-SP: 26181