JUCELY APARECIDA DA ROSA

Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas ovariectomizadas

São Paulo

2014

JUCELY APARECIDA DA ROSA

Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas ovariectomizadas

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Área de concentração: Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Xavier de Oliveira

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rosa, Jucely Aparecida da.

Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas ovariectomizadas / Jucely Aparecida da Rosa ; orientador Jefferson Xavier de Oliveira. -- São Paulo, 2014.

84 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Ovariectomia. 2. Ratos. 3. Estrôncio. 4. Regeneração óssea. 5. Osteoporose.
I. Oliveira, Jefferson Xavier de. II. Título.

Rosa JA. Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas ovariectomizadas. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Diagnóstico Bucal.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço ao meu amigo e orientador o **Prof. Dr. Jefferson Xavier de Oliveira** pela confiança no meu potencial e pelos ensinamentos de grande importância para a minha formação.

À minha família, em especial à minha mãe **Maria Antônia Ribeiro** pelo incentivo e carinho.

À **Profa Dra. Kumiko Koibuchi Sakane** da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) pelo apoio e carinho, e pela enorme colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

À colega **Ana Paula de Lima** da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela amizade e disposição em me ajudar nas análises desse trabalho.

À colega **Patrícia Marcondes** da UNIVAP pela ajuda nos experimentos.

À colega **Mariana Matheus Moreira** do Laboratório de Biologia Oral pela ajuda durante meus experimentos.

À colega **Vivian Bradaschia Corrêa** do Laboratório de Biologia Oral pelo auxílio na elaboração desse trabalho.

À **Profa. Dra. Emiko Saito Arita** pelo apoio e pela amizade.

Aos meus **colegas de Pós-graduação** pela convivência e apoio.

Aos **Professores da Disciplina de Radiologia** pela contribuição em minha formação.

À secretária de Disciplina de Radiologia, **Maria Aparecida Pinto**, pela disposição em todos os momentos que precisei de auxílio, além da amizade decorrente do nosso convívio.

Ao Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP, na pessoa do **Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves**.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À **CAPES** pela concessão da bolsa.

À bibliotecária **Glauci Elaine Damasio Fidélis** pela revisão e correção deste trabalho.

Ao **Fernando Koibuchi Sakane** pelo apoio e carinho durante todo esse período da Pós-graduação.

RESUMO

Rosa JA. Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas ovariectomizadas [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2014. Versão Corrigida.

O ranelato de estrôncio (RS) diminui a reabsorção óssea e ao mesmo tempo age como um agente anabólico deste tecido. Este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da ovariectomia e do tratamento com RS na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas. Vinte e sete ratas adultas foram submetidas a ovariectomia ou cirurgia *Sham* e, após trinta dias, defeitos ósseos em fêmures foram confeccionados e os animais divididos em três grupos: ovariectomizadas (OVZ), cirurgia *Sham* (SHAM) e ovariectomizadas + tratamento com 625 mg/kg/dia de RS (RS). A eutanásia foi realizada quatro semanas após a cirurgia do defeito ósseo. A reparação do defeito ósseo foi analisada por microtomografia computadorizada (μ CT) e a composição química do tecido ósseo foi verificada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). O grupo SHAM apresentou em média volume ósseo (BV) superior ao grupo OVZ ($p=0,014$) e o volume ósseo relativo (BV/TV) foi cerca de 8% superior ao grupo OVZ. A comparação entre SHAM e RS apresentou valores limítrofes para essas variáveis. A espessura trabecular (Tb.Th) no grupo RS foi significativamente maior que no grupo OVZ cerca de 1,8% ($p = 0,049$) e não diferiu em média do grupo SHAM. Não houve diferenças significativas nas relações que avaliam compostos inorgânicos sobre orgânicos nos grupos. A razão das áreas das bandas em 1057 e 1023 cm^{-1} para o cálculo do IC foi 1.024 no grupo SHAM, 1.015 no grupo RS e 1.108 no grupo OVZ. No estudo da banda de amida III foi observado nos animais ovariectomizados uma possível mudança na estrutura secundária das proteínas da matriz devido a uma diminuição das estruturas α -hélice e random coil (RC) e aumento de β -sheet. A maturidade do colágeno estimada pela relação de sub-bandas de amida I (1660/1690) foi menor no grupo RS. Neste grupo houve um aumento significativo de estrôncio (Sr) incorporado ao tecido ósseo e uma diminuição de cálcio (Ca)

avaliados pela técnica do EDS. Os resultados demonstram que o tratamento sistêmico com RS promoveu a reparação óssea e melhorou a microarquitetura do osso neoformado no interior do defeito. No entanto, os resultados das análises com FTIR sugerem que o RS não reverteu as alterações na matriz orgânica ocasionadas pela ovariectomia e diminuiu as ligações cruzadas de colágeno maduras.

Palavras-chave: Osteoporose. Ratas ovariectomizadas. Ranelato de estrôncio. Regeneração óssea. Microtomografia por raios-X. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

ABSTRACT

Rosa JA. Influence of strontium ranelate on the repair of bone defects in femurs and molecular components of bone in ovariectomized rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Strontium ranelate (SR) decreases bone resorption and at the same time acts as an anabolic agent in this tissue. This study was conducted to evaluate the effects of ovariectomy and treatment with SR on the repair of bone defects and molecular components of bones in femurs. Adult female rats (n=27) were subjected to ovariectomy or Sham surgery. Thirty days after surgery, a defect was made in the femur and the animals were divided into three groups: ovariectomy (OVZ), Sham surgery (SHAM) and ovariectomy plus treatment with SR, 625 mg / kg / day (SR). Euthanasia was performed four weeks after surgery to cause the bone defect. Repair in bone defect was assessed by computed microtomography (μ CT) and the chemical composition of bone tissue was analyzed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The SHAM group showed mean values for bone volume (BV) higher than those of the OVZ group ($p = 0.014$) and the relative bone volume (BV / TV) was about 8% higher than that of the OVZ group. Comparison between SHAM and SR showed borderline values for these variables. In the SR group, the average value for trabecular thickness (Tb.Th) was significantly higher ($\sim 1.8\%$) than that in the OVZ ($p = 0.049$) group and did not differ from that of the SHAM group. Significant difference was not observed in the relation between inorganic and organic compounds in the three groups. The ratio of the areas of the bands in 1057 and 1023 cm^{-1} for the calculation of IC was 1,024 in the SHAM group, 1,015 in the RS group and 1,108 in OVZ group. In the study of the amide III band, a change in the proportion of secondary structure of matrix proteins was observed in ovariectomized animals, possibly a decrease in of α -helical and random coil (RC) and an increase in β -sheet structures. The collagen cross-linking network maturity estimated by the relation between amide I subbands (1660/1690) showed the smaller number in the SR group. In this group, a significant increase in the amount of strontium (Sr) and a decrease in the amount of calcium (Ca) embedded to

bone tissue, as assessed by the EDS technique, were also observed. The results demonstrate that systemic treatment with SR promoted bone repair and improved microarchitecture of the newly formed bone within the defect. However, results of analyses with FTIR suggest that the SR has not reversed the alterations caused by ovariectomy in the organic matrix and decreased cross-linking of collagen mature.

Keywords: Osteoporosis. Ovariectomized rats. Strontium ranelate. Bone regeneration. X-ray microtomography. Fourier transform infrared spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Espectro de osso com informações dos constituintes orgânicos e inorgânicos.....	26
Figura 2.2 - Representação esquemática do algoritmo usado no método 3D para o cálculo da espessura trabecular (A) e da separação trabecular (B).....	28
Figura 4.1 - Ovariectomia.....	32
Figura 4.2 - Confeção do defeito ósseo.....	33
Figura 4.3 - Gavagem para administração do medicamento.....	34
Figura 4.4 - Exemplo de útero de uma rata que sofreu cirurgia <i>Sham</i> , mostrando dimensões normais e exemplos de úteros mostrando atrofia, provenientes de ratas ovariectomizadas (OVZ e RS).....	35
Figura 4.5 - <i>Software</i> Dataviewer exibindo os cortes na vistas coronal, transversal e sagital.....	36
Figura 4.6 - <i>Software</i> CT-Analyzer (CTAn) Mostrando o ROI circular de 232 pixel de diâmetro.....	37
Figura 4.7 - Visualização 3D do VOI a partir do <i>software</i> CT-Vol.....	38
Figura 4.8 - Confeção das pastilhas de KBr (a-c) e o espectrofotômetro (d).....	39
Figura 4.9 - Suporte com as amostras e Máquina de MEV/EDS (modelo EVO-MA40).....	43
Figura 4.10 - Imagens obtidas via MEV/EDS das amostras: a) SHAM; b) OVZ; c) RS.....	43

Figura 5.1 - Imagens 2-D μ CT de cortes transversais, coronais e sagitais (direita →esquerda) da região central do defeito ósseo; grupo OVZ (a), grupo RS (b) e grupo SHAM (c).....	45
Figura 5.2 - Espectros FTIR dos grupos SHAM, RS e OVZ.....	53
Figura 5.3 - Ajuste de curva na região de $1200-900\text{ cm}^{-1}$, grupo OVZ.....	58
Figura 5.4 - Ajuste de curva na região de $1200-900\text{ cm}^{-1}$, grupo SHAM.....	58
Figura 5.5 - Ajuste de curva na região de $1200-900\text{ cm}^{-1}$, grupo RS.....	59
Figura 5.6 - Sub-bandas de amida I ajustadas, grupo SHAM.....	60
Figura 5.7 - Sub-bandas de amida I ajustadas, grupo OVZ.....	61
Figura 5.8 - Sub-bandas de amida I ajustadas, grupo RS.....	61
Figura 5.9 - Sub-bandas de amida III ajustadas, grupo SHAM.....	63
Figura 5.10 - Sub-bandas de amida III ajustadas, grupo OVZ.....	63
Figura 5.11 - Sub-bandas de amida III ajustadas, grupo RS.....	64
Figura 5.12 - Espectro de EDS de uma amostra do grupo SHAM.....	65
Figura 5.13 - Espectro de EDS de uma amostra do grupo OVZ.....	65
Figura 5.14 - Espectro de EDS de uma amostra do grupo RS.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - <i>Boxplots</i> para BV pixel ³ (mil) por grupo.....	47
Gráfico 5.2 - <i>Boxplots</i> para BV/TV (%) por grupo.....	48
Gráfico 5.3 - <i>Boxplots</i> para Tb.N (1/pixel) por grupo.....	48
Gráfico 5.4 - <i>Boxplots</i> para Tb.Sp (pixel) por grupo.....	49
Gráfico 5.5 - <i>Boxplots</i> para Tb.Th (pixel) por grupo.....	49
Gráfico 5.6 - Comparações múltiplas de Tukey para BV pixel ³ (mil) entre grupos.	50
Gráfico 5.7 - Comparações múltiplas de Tukey para BV/TV (%) entre grupos.....	51
Gráfico 5.8 - Comparações múltiplas de Tukey para Tb.Th entre grupos.....	51
Gráfico 5.9 - <i>Boxplots</i> para IC por grupo.....	55
Gráfico 5.10 - <i>Boxplots</i> para I Fosfato/I Amida I por grupo.....	55
Gráfico 5.11 - <i>Boxplots</i> para A Fosfato/A Amida I e II por grupo.....	56
Gráfico 5.12 - <i>Boxplots</i> para A Fosfato/A colágeno + A Amida III por grupo.....	56
Gráfico 5.13 - <i>Boxplots</i> para A Colágeno/A Amida III por grupo.....	57
Gráfico 5.14 - Porcentagem estimada das estruturas secundárias das proteínas nos grupos SHAM,OVZ e RS.....	64
Gráfico 5.15 - <i>Boxplots</i> para P por grupo.....	67

Gráfico 5.16 - <i>Boxplots</i> para Ca por grupo.....	68
Gráfico 5.17 - <i>Boxplots</i> para Sr por grupo.....	68
Gráfico 5.18 - Comparações múltiplas de Kruskal-Walis e intervalos de confiança paramétricos para Ca entre grupos.....	69
Gráfico 5.19 - Comparações múltiplas de Kruskal-Walis e intervalos de confiança paramétricos para Sr entre grupos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ CT	Microtomografia computadorizada
BS	Área superficial das trabéculas ósseas
BS/BV	Razão da superfície óssea pelo volume ósseo
BS/TV	Razão da área superficial pelo volume total
BV	Volume ósseo da amostra
BV/TV	Razão entre volume ósseo e volume da amostra
DHLNL	Dihidroxisisonorleucina
DMO	Densidade mineral óssea
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-x
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
PYR	Piridinolina
RS	Ranelato de estrôncio
ROI	Região de interesse do objeto
Tb.N	Número trabecular
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular
TV	Volume da amostra
VOI	Volume de interesse do objeto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Osteoporose	18
2.2 Ranelato de estrôncio.....	19
2.3 Espectroscopia no infravermelho	24
2.4 Microtomografia computadorizada.....	27
3 PROPOSIÇÃO.....	30
4 MATERIAL E MÉTODO.....	31
4.1 Animais	31
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	31
4.2.1 Anestesia.....	31
4.2.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia.....	32
4.2.3 Execução da lesão óssea.....	33
4.3 Tratamento.....	34
4.4 Eutanásia dos animais e fixação das peças ósseas.....	34
4.5 verificação dos efeitos da ovariectomia.....	35
4.6 Análise dos resultados.....	36
4.6.1 Análise por microtomografia computadorizada.....	36
4.6.2 Espectroscopia no infravermelho.....	38
4.6.2.1 <i>Índice de cristalinidade.....</i>	<i>39</i>
4.6.2.2 <i>Razão das intensidades das bandas de material inorgânico (fosfato) pelo orgânico (amida I).....</i>	<i>40</i>
4.6.2.3 <i>Razão das áreas de bandas de fosfato (inorgânico) e material orgânico.....</i>	<i>40</i>
4.6.2.4 <i>Ajuste de curva da banda de amida I.....</i>	<i>41</i>
4.6.2.5 <i>Ajuste de curva da banda de amida III.....</i>	<i>41</i>

4.6.2.6 Razão das áreas das bandas de colágenos pela amida III.....	42
4.6.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X.....	42
4.6.4 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Microtomografia computadorizada.....	45
5.2 Espectroscopia no infravermelho.....	52
5.2.1 Índice de cristalinidade.....	57
5.2.2 Razão das intensidades das bandas de material inorgânico (fosfato) pelo orgânico (amida I).....	59
5.2.3 Razão das áreas de bandas de fosfato e material orgânico.....	59
5.2.4 Ajuste de curva da banda de amida I.....	60
5.2.5 Ajuste de curva da banda de amida III.....	62
5.2.6 Razão das áreas das bandas de colágenos pela amida III.....	64
5.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X.....	65
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética.....	84

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma enfermidade crônica, multifatorial relacionada ao envelhecimento, que assume uma importância crescente, tendo se em vista o aumento da população idosa. Ela é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração de sua microarquitetura devido a um aumento da reabsorção óssea, o que resulta em fragilidade óssea e aumento do risco de fraturas.

A osteoporose pode retardar a reparação óssea e também prejudicar a formação de calo ósseo em fraturas. Para diminuir o tempo de reparação óssea e melhorar a qualidade desse tecido várias drogas antireabsorptivas e agentes formadores de tecido ósseo são estudados (Li et al., 2010).

O ranelato de estrôncio (RS) é um fármaco utilizado para tratamento da osteoporose. Ele pode estimular a regeneração óssea pelo aumento do número de células pré-osteoblásticas e inibição da reabsorção óssea pelas células osteoclásticas (Marie et al., 2011). As propriedades mecânicas e a densidade mineral do tecido ósseo osteoporótico podem ser positivamente afetadas pelo tratamento com o RS diminuindo o risco de fraturas (Ammann et al., 2004).

O efeito do RS na reparação óssea foi investigado em modelos animais com fraturas em tíbias apresentando resultados benéficos como aumento do calo ósseo e melhora das propriedades biomecânicas desse tecido (Li et al., 2010; Ozturan et al., 2011). Embora a eficácia desse fármaco na reparação de fratura tenha sido demonstrada, há escassez de dados sobre seus efeitos na reparação de defeito ósseo e também pouco se sabe sobre os componentes biomoleculares do osso formado durante o tratamento.

Assim, torna-se importante o estudo do efeito do RS sobre os componentes orgânicos e inorgânicos do osso em um modelo experimental que simule a osteoporose, e se o tratamento sistêmico pode promover a reparação de defeito ósseo neste modelo de estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoporose

A osteoporose é uma doença osteometabólica bastante comum, mais frequentemente associada à deficiência estrogênica causada pela menopausa e envelhecimento. Ela é caracterizada por uma redução crônica e progressiva da densidade mineral da matriz óssea, tendo como resultado a perda óssea e mudanças em sua microarquitetura, aumentando o risco de fraturas (Cesareo et al., 2010; Li et al., 2010; Ozturan et al., 2011; Yalin et al., 2012).

O diagnóstico da osteoporose adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é avaliado por meio da absorciometria de dupla emissão de raios-X (DXA). Um colimador colhe a radiação emitida, avaliando a quantidade de cálcio (Ca) pela área medida. Um computador analisa os resultados obtidos e os compara com um banco de dados de pessoas da mesma etnia, peso, altura e idades de 20 até 100 anos. Os resultados são comparados à média de indivíduos jovens do mesmo sexo, com valores no pico de massa óssea (T score). Também são comparados aos valores médios da densidade mineral óssea (DMO) das pessoas de mesma idade (Z score). São calculadas as porcentagens relativas e os desvios padrões (DPs) das médias. Os resultados são considerados, conforme consenso da OMS, como normal, quando a densitometria mostra até -1 desvio padrão (DP) no T score; osteopenia, de -1 a $-2,5$ DPs e osteoporose de $-2,5$ DPs para mais. A osteoporose estabelecida é a denominação utilizada quando o paciente além do $DP < -2,5$ apresenta uma fratura osteoporótica (Souza, 2010; Martínez-Morillo et al., 2012).

A osteoporose pode ser primária ou secundária. A forma primária é classificada em tipo I e tipo II. No tipo I, existe rápida perda óssea e ocorre em mulheres pós-menopausa. Esse tipo atinge principalmente, o osso trabecular. A tipo II, ou senil, é relacionada ao envelhecimento e aparece por deficiência crônica de Ca, aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea (Gali, 2001). Em contraste a osteoporose secundária é decorrente de medicamentos, outras condições ou doenças como, por exemplo, hipertireodismo, desordens

adrenais, mieloma múltiplo e uso crônico de corticóides. Quando não há causas conhecidas a osteoporose é chamada de idiopática (Souza, 2010).

Os principais fatores de risco para osteoporose são: idade avançada, gênero feminino, genética, etnias amarela e branca, uso abusivo de bebidas alcoólicas, café, uso sistêmico de corticóides, tabagismo, sedentarismo, baixa ingestão de cálcio e vitamina D₃, doenças inflamatórias crônicas e deficiência estrogênica (Souza, 2010; Martínez-Morillo et al., 2012).

A deficiência estrogênica causada pela menopausa é considerada um dos principais fatores de risco para osteoporose em mulheres (Compston, 2001; Cesareo et al., 2010). Após a menopausa, ocorre um desequilíbrio no processo de remodelação óssea a favor da reabsorção, levando a uma perda de massa óssea e consequentemente um aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fraturas (Marie, 2005; Cesareo et al., 2010).

Atualmente diversos fármacos têm sido utilizados para o tratamento da osteoporose, podendo ser divididos em dois grupos principais: agentes anti-reabsortivos do tecido ósseo (estrogênios, calcitonina e bisfosfonatos) e agentes estimuladores da formação óssea (paratormônio e teriparatida) (Souza, 2010). Em contraste com esses fármacos o RS, droga também utilizada para tratamento de osteoporose, apresenta dupla ação sobre o tecido ósseo pois, tanto pode estimular a formação óssea como também diminuir sua reabsorção, equilibrando o *turnover* ósseo a favor da formação (Cebesoy et al., 2007; Sun et al., 2010).

2.2 Ranelato de estrôncio

O RS é um agente químico formado por dois átomos estáveis de estrôncio (Sr²⁺), constituindo a parte ativa do composto, e uma molécula orgânica, o ácido ranélico, que permite o melhor compromisso em termos de peso molecular, farmacocinética e aceitabilidade do medicamento. O nome químico aplicado ao RS é 5-(bis[carboximetil]amino)-2-carboxi-4-ciano-3-tiofenacético (Marie et al., 2011; Yalin et al., 2012).

O estrôncio (Sr) é um metal alcalino terroso pertencente ao segundo grupo da tabela periódica. Os elementos desse grupo formam íons divalentes nos fluidos biológicos e variam no grau de ligação às proteínas plasmáticas. O grau de ligação do Sr às proteínas do plasma ou soro é semelhante ao do Ca. Como um cátion bivalente, o Sr não é metabolizado e a sua excreção ocorre por via renal (Pors Nielsen, 2004).

Os íons de Sr possuem uma elevada afinidade pela hidroxiapatita (HA) do tecido ósseo e pode, em certa medida, substituir íons de Ca no cristal de HA através de troca iônica de superfície ou substituição sem alterar os cristais de HA (Dahl et al., 2001; Boivin; Meunier, 2003). Em contraste com o Sr radioativo, que tem efeitos tóxicos sobre as células ósseas, o elemento não radioativo influencia a remodelação óssea por inibição da reabsorção e estimulação da formação (Yalin et al., 2012).

O RS é a única droga utilizada no tratamento da osteoporose que demonstra um modo dual de ação para o metabolismo ósseo. Ele suporta a formação óssea (osteogênese) estimulando a divisão de precursores de osteoblastos e aumentando a síntese de proteínas colágena e não colágena e simultaneamente diminui a reabsorção óssea por inibição da atividade e da diferenciação dos osteoclastos (Przedlacki, 2011). Sua atividade depende de vários mecanismos incluindo ativação dos receptores de Ca, localizados em osteoblastos e osteoclastos, e efeitos sobre o sistema constituído pelo receptor ativador do fator nuclear – kappa Beta (RANK), RANK ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (Atkins et al., 2009; Przedlacki, 2011).

A interação entre RANK e RANKL é a via mais conhecida na diferenciação e ativação osteoclástica. Precursores de osteoblastos e osteoblastos expressam RANK L, uma molécula que se liga ao receptor RANK nas células precursoras de osteoclastos e assim ativa a sinalização intracelular resultando em diferenciação dos osteoclastos. Precursores dos osteoblastos e osteoblastos também liberam OPG, uma proteína que bloqueia essa interação, inibindo assim a diferenciação dos osteoclastos (Marie et al., 2011).

Atkins et al. (2009) estudaram os efeitos do RS na diferenciação de osteoblastos humanos e observaram que o RS aumentou a expressão e produção de OPG e diminuiu a expressão de RANK L por osteoblastos *in vitro*. O aumento da produção de OPG e a diminuição da expressão de RANK L pode consistir num

importante mecanismo de redução na diferenciação de osteoclastos pelo RS *in vitro* (Marie et al., 2011).

Em adição aos seus efeitos sobre a reabsorção óssea, experimentos *in vitro* com cultura de osteoblastos primários mostraram que o RS induz efeitos positivos sobre a osteoblastogênese e atividade dos osteoblastos. Foi mostrado que o RS aumenta a replicação de células pré-osteoblásticas e reduz a apoptose de osteoblastos (Brennan et al., 2009). Além disso, foi observado que o RS aumenta muitos marcadores de osteoblastos, tais como fosfatase alcalina, colágeno do tipo 1, sialoproteína óssea e osteocalcina em células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea e em osteoblastos imaturos (Ammann et al., 2004; Atkins et al., 2009; Bonnelye et al., 2008; Zhu et al., 2007).

O efeito positivo do RS na diferenciação de pré-osteoblastos resulta num aumento da formação do nódulo ósseo, uma característica da osteogênese *in vitro* (Atkins et al., 2009; Querido; Farina, 2013). O Sr é incorporado no nódulo ósseo formado em culturas de células osteoblásticas tratadas com o RS (Querido; Farina, 2013).

O RS é administrado numa dose diária de 2g, por via oral, sua biodisponibilidade é reduzida em 60-70% quando combinado com alimentos e administração com Ca. Devido à absorção relativamente baixa do Sr, a ingestão de alimentos e Ca deve ser evitada antes e após a administração do fármaco (Przedlacki, 2011). Efeitos adversos ocorrem mais frequentemente nos primeiros meses de terapia como vômito, dores abdominais, irritações da mucosa oral, dores articulares e musculares, reações alérgicas, prurido e urticárias (Przedlacki, 2011).

Dois estudos multinacionais, duplo cego, placebo-controlado, fase III, em mulheres na pós-menopausa com osteoporose demonstraram a eficácia do RS: SOTI (Intervenção Terapêutica de Osteoporose Espinhal) associada ao efeito do RS no risco de fraturas espinhais, e TROPOS (Tratamento da Osteoporose Periférica) que avalia o efeito do RS em fraturas não espinhais (Reginster et al., 2012).

O SOTI incluiu 1649 mulheres na pós-menopausa de 70 anos, em média, com osteoporose. Durante um período de três anos, no grupo RS houve um aumento da DMO na coluna lombar, no colo do fêmur e no quadril e reduziu o risco relativo de novas fraturas vertebrais (Reginster et al., 2005; Cesareo et al., 2010).

O TROPOS incluiu 5091 mulheres pós-menopausicas com osteoporose com idade acima de 74 anos ou entre 70 e 74 anos com fator de risco adicional para fratura osteoporótica (história de fratura por osteoporose após menopausa, quedas frequentes, história materna de fratura por osteoporose) com DMO do colo do fêmur $< 0.600 \text{ g/cm}^2$. Em três anos, houve um aumento de 5.7% da DMO no colo do fêmur e de 7.1% da DMO no quadril em comparação com o grupo placebo. A incidência de eventos adversos foi semelhante em ambos os grupos (Reginster et al., 2005; Cesareo et al., 2010).

Análise do tratamento a longo prazo (10 anos) com o RS mostrou um aumento sustentável da DMO de mulheres com osteoporose pós-menopausa e sua eficácia anti-fratura neste período (Reginster et al., 2012). Outro estudo comparou a eficácia do RS e do alendronato na microarquitetura óssea após um ano de tratamento em mulheres, e mostrou que o RS aumenta a espessura da cortical óssea e o volume ósseo, em comparação com os valores basais e com o alendronato (Rizzoli et al., 2010).

A atividade do RS foi avaliada em vários modelos de estudo com animais. Ele foi primeiramente testado em animais osteopênicos, a fim de avaliar sua eficácia na prevenção de perda óssea (Marie, 2005). O modelo de ovariectomia em ratas é caracterizado pela perda de osso trabecular devido a um aumento da taxa de reabsorção óssea, o que predomina sobre a formação óssea, como encontrado em mulheres na pós-menopausa (Modrowski et al., 1993).

Bain et al. (2009) avaliaram os efeitos do RS sobre os determinantes da resistência óssea em ratas ovariectomizadas (OVZ). Os animais foram tratados por 52 semanas com 125, 250 e 625 mg de RS. Observaram que o tratamento com o RS em todas as dosagens estudadas foi bem tolerado e seguro, uma vez que não teve efeitos adversos significativos sobre a sobrevivência do animal, consumo de alimentos, alterações de peso corporal ou patologia grave. Nos animais que receberam 625 mg/kg/dia de RS foi observado uma concentração de estrôncio no soro equivalente àquela obtida em mulheres com osteoporose tratadas com 2 g/dia. O tratamento com RS impediu a diminuição da massa óssea induzida pela ovariectomia.

Sun et al. (2010) estudaram os efeitos do alendronato e do RS no osso cortical e trabecular de ratas tratadas com glicocorticóides. Observaram que ambos

exercem um efeito positivo sobre o tecido ósseo, diminuindo a perda de massa óssea induzida pelo glicocorticóide, no entanto, o RS na dose 900 mg/kg foi mais eficaz do que o alendronato 1 mg/kg na estimulação de uma resposta anabólica nesse tecido.

Fuchs et al. (2008) estudaram os efeitos do RS em ratas OVZ. Os animais recebiam doses de 25 e 150 mg/kg/dia e nessas doses mais baixas o RS não induziu uma resposta anabólica no tecido ósseo.

Nos estudos com animais, as doses de RS são mais altas do que as doses administradas em humanos, mas os níveis plasmáticos obtidos em animais tratados com 625 mg/kg/dia ficam próximos aos valores observados em pacientes tratados com 2 g/dia. Essa diferença entre humanos e ratos está relacionada a uma diminuição da absorção intestinal do Sr em ratos (Ammann, 2006).

Morohashi et al. (1994) estudou o efeito de diferentes doses de Sr em ratos e mostraram que houve um aumento significativo de Ca nos ossos dos animais que receberam uma dose ideal de Sr e nos que receberam altas doses desse elemento resultou em hipocalcemia. Em outro estudo, esse grupo demonstrou que em doses ideais o Sr não exerce efeitos tóxicos sobre as células ósseas ou sobre a mineralização e previne o aumento da taxa de *turnover* ósseo induzido pela ovariectomia (Morohashi et al., 1995).

Em ratos saudáveis, o RS aumenta a massa óssea trabecular, o número de trabéculas e a sua espessura resultando numa melhoria da força óssea (Boyd et al., 2011). Efeitos a longo prazo do RS no tecido ósseo foi investigado em ratos tratados com várias doses (225, 450, 625 e 900 mg) por dois anos. A massa óssea, propriedades mecânicas e microarquitetura foram avaliadas em vértebras e fêmur. Aumentos dose-dependentes da resistência e massa óssea do corpo vertebral e do fêmur foram detectados. Além disso, também foram avaliados a atividade da fosfatase alcalina plasmática e os níveis séricos do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) e ambos aumentaram nos animais tratados (Ammann et al., 2004).

O aumento da força óssea através do RS também foi observado em modelos experimentais de osseointegração. Em ratos saudáveis tratados durante 8 semanas com o RS, a força necessária para o arrancamento de implantes foi mais elevada do que nos animais do grupo controle. Este efeito foi relacionado a uma melhor

osseointegração e a um efeito positivo sobre a microarquitetura e as propriedades materiais do osso na periferia do implante (Maïmoun et al., 2010).

Li et al. (2012) investigaram os efeitos do RS na osseointegração de implantes de titânio em ratas ovariectomizadas e demonstraram por meio de teste biomecânico, microtomografia computadorizada (μ CT) e análise histomorfométrica que na dose de 625 mg/kg/dia o RS pode melhorar a osseointegração após 12 semanas de tratamento.

O efeito do RS sobre a reparação óssea foi avaliado em modelo animal com fratura em tíbia. Li et al. (2010) avaliaram o efeito do tratamento sistêmico com RS na reparação de fratura óssea em tíbias de ratas OVZ e revelaram que o RS na dose de 625 mg/kg/dia promove a cura da fratura dentro de um período de 8 semanas. O RS aumenta o volume do calo ósseo e melhora as propriedades biomecânicas desse tecido.

Ozturan et al. (2011) avaliaram o efeito do RS na reparação de fraturas em ratas. Os animais osteoporóticos com fratura em tíbia receberam ração contendo 135 mg de RS correspondendo a uma dose de 450 mg/kg/dia por 6 semanas. Após as análises radiográfica, histológica e teste biomecânico concluíram que o fármaco teve um efeito benéfico na reparação de fratura.

O uso do Sr incorporado em material bioativo foi recentemente estudado na reparação de defeito ósseo em animais osteopênicos e os resultados mostraram que a liberação local de Sr pode melhorar a reparação óssea (Wei et al., 2014).

2.3 Espectroscopia no infravermelho

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica que detecta modos vibracionais característicos de grupos químicos funcionais numa amostra (Paschalis et al., 2011; Vidal; Mello, 2011). Um grupo funcional tende a absorver a radiação infravermelha em um número de onda específico (cm^{-1}) e as ligações químicas dos grupos funcionais tendem a vibrar em frequências características (Vidal; Mello, 2011). Com esta técnica obtemos

informações que possibilitam caracterizar moléculas e identificar grupos funcionais e a estrutura molecular (Veloso, 2013).

As vibrações moleculares podem resultar em alterações no comprimento das ligações, sendo essas denominadas estiramentos simétrico e assimétrico, ou na variação no ângulo das ligações, sendo denominada deformação angular que pode ser do plano ou fora do plano (Barbosa, 2011).

O espectro de infravermelho é constituído por bandas de absorção que correspondem às frequências de vibrações de ligações químicas que compõem o material (Barbosa, 2011). A intensidade dos picos no espectro é uma indicação direta da quantidade do material presente (Paschalis et al., 2011).

As intensidades das bandas podem ser expressas como transmitância ou absorbância (Barbosa, 2011). A transmitância é conceituada como a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide; e a absorbância é o logaritmo na base dez do recíproco da transmitância (Silverstein et al., 2005).

A FTIR têm sido amplamente utilizada para analisar os componentes moleculares de biomateriais e tecidos (Camacho et al., 2003). Em tecidos mineralizados foram realizados estudos do metabolismo ósseo e das alterações químicas e estruturais causadas com o envelhecimento do osso e também das modificações causadas por patologias como a osteoporose e os efeitos das terapias (Camacho et al., 2003; Boskey; Mendelsohn, 2005; Paschalis et al., 2011; Kimura-Suda et al., 2013).

As principais bandas de absorção presentes no espectro infravermelho do osso são dos grupos funcionais amida I, amida II e amida III presentes no colágeno, o grupamento fosfato (PO_4^{-3}) e carbonato (CO_3^{2-}) da HA, o OH^- e a água (H_2O) (Veloso, 2013; Kimura-Suda et al., 2013). A figura 2.1 mostra um espectro representativo de FTIR do osso com as principais frequências de interesse.

A amida I é resultado do estiramento da ligação peptídica $\text{C}=\text{O}$, a amida II é resultado misto do estiramento $\text{C}-\text{N}$ e deformação angular no plano do $\text{N}-\text{H}$, a amida III resulta da mistura alongamento $\text{C}-\text{N}$ e deformação angular no plano $\text{N}-\text{H}$ com contribuições adicionais de estiramento $\text{C}-\text{C}_\alpha$ (Paschalis et al., 2011).

Figura 2.1 – Espectro de osso com informações dos constituintes orgânicos e inorgânicos (Paschalis et al., 2011)

Os principais parâmetros do tecido ósseo medidos pela FTIR são: relação matriz e mineral, cristalinidade, e maturidade do colágeno (Paschalis et al., 2011). Esta pode ser estimada usando a razão das áreas das sub-bandas de amida I localizadas em 1660 cm⁻¹ e 1690 cm⁻¹. Nestas posições estão localizadas as duas principais ligações cruzadas de colágeno, piridinolina (PYR) e dihidroxilisnonorleucina (DHLNL), respectivamente (Paschalis et al., 2001; Veloso, 2013). Com a maturação do colágeno, o conteúdo de DHLNL diminui, enquanto que o de PYR aumenta (Paschalis et al., 2001).

A razão entre o fosfato integrado e amida I é geralmente representativa da quantidade de mineral para a quantidade de colágeno presente (Paschalis et al., 2011).

Para análise qualitativa do processo de regeneração óssea por meio da FTIR pode ser utilizado o índice de mineralização. Esse é calculado como a razão entre a intensidade de absorção máxima do grupo inorgânico pela intensidade de absorção máxima do grupo orgânico. Um aumento desse índice indica processo de regeneração óssea (Rochkind et al., 2004).

Características como o tamanho e perfeição do cristalito, conteúdo de fosfato, conteúdo de carbonato e ambiente mineral podem ser alterados substancialmente em função do tipo de tecido, idade e patologia (Miller et al., 2001).

Mudanças observadas na região do espectro ($1200\text{-}900\text{cm}^{-1}$) refletem a maturação dos cristais de HA e podem ser quantificadas por análises com ajuste de curva nesta região (Pleshko et al., 1991).

2.4 Microtomografia computadorizada (μ CT)

A μ CT é uma técnica de imagen de alta-resolução não destrutiva que permite visualizar por meio de cortes transversais, em três dimensões, a estrutura morfológica e avaliar a qualidade do tecido ósseo (Sales, 2010). Ela possibilita identificar microfraturas, determinar e relacionar padrões de alterações morfológicas da microarquitetura óssea de vértebras humanas normais, osteopênicas e osteoporóticas em função da perda de massa óssea (Cesar et al., 2013).

A μ CT foi introduzida pela primeira vez por Feldkamp e colaboradores na década de 80 e tornou-se o padrão ouro para a avaliação da morfologia e microarquitetura óssea em ratos e outros modelos de animais pequenos (Bouxsein et al., 2010). Esta técnica não fornece informações diretas sobre a função celular e atividade de remodelamento ósseo, o que continua sendo domínio da histologia (Burghardt et al., 2011).

A μ CT capta dados adquiridos em vários ângulos de visualização, a partir da atenuação de raios-X para reconstruir uma representação da amostra tridimensional (3D), que caracteriza a distribuição espacial da densidade do material (Bouxsein et al., 2010). A resolução espacial da μ CT pode chegar até $0,5\text{ }\mu\text{m}$, o que é suficiente para medição de estruturas como trabéculas ósseas de ratos que tem espessura de 20 a $30\text{ }\mu\text{m}$ (Martín-Badosa et al., 2003).

Existem inúmeras vantagens de usar a μ CT para avaliação de morfologia e massa óssea em espécimes excisados: Ela permite a medição direta em 3D da morfologia trabecular, tais como a espessura e separação trabecular, em vez de conferir esses valores com base em modelos estereológicos bidimensionais, como é feito nas avaliações histológicas convencionais; em comparação com a histologia, um volume significativamente maior de interesse é analisado e as medições podem ser realizadas muito mais rapidamente; a avaliação da morfologia óssea por μ CT

não é destrutiva, assim as amostras podem ser utilizadas posteriormente para outros ensaios, tais como a histologia ou testes mecânicos (Bouxsein et al., 2010).

A análise morfométrica por μ CT é realizada utilizando-se a reconstrução bidimensional (2D) ou a reconstrução em 3D do volume da amostra. Na primeira utiliza-se técnicas estereológicas assumindo-se que a amostra óssea tem uma microestrutura constante de placas ou bastonetes. A segunda é realizada diretamente no volume reconstruído da amostra óssea (Hildebrand et al., 1999).

Alguns dos principais parâmetros morfométricos obtidos pelo *software* de análise do μ CT são: o volume ósseo da amostra (BV) a razão entre o volume ósseo e o volume total da amostra (BV/TV), utilizada para caracterizar a quantidade de massa óssea da estrutura e representar o teor mineral da amostra, o número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular (Tb.N), a razão entre a medida da área superficial do osso e o seu volume (BS/BV), a espessura trabecular (Tb.Th) e a separação trabecular (Tb.Sp) (Lima et al., 2009; Cesar et al., 2013). Os parâmetros BV, área superficial das trabéculas ósseas (BS) e TV são considerados índices primários e os BV/TV, BS/BV e BS/TV índices normalizados. Estes são utilizados nos casos em que as amostras em estudo tenham dimensões diferentes (Silva, 2009).

Na análise 3D o parâmetro Tb.Th é calculado utilizando-se esferas cujo diâmetro devem preencher a estrutura da trabécula. No cálculo do parâmetro Tb.Sp utiliza-se o mesmo princípio de determinação do anterior (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Representação esquemática do algoritmo usado no método 3D para o cálculo da espessura trabecular (A) e da separação trabecular (B) (Bouxsein et al., 2010)

Comparação de parâmetros estruturais de espécimes examinadas com histomorfometria clássica e com os calculados a partir de imagens de μ CT e testes mecânicos sugerem que a quantidade e a arquitetura do osso trabecular contribuem para força mecânica. Mudanças na resistência do osso podem ser explicadas por mudanças microestruturais deste tecido (Goulet et al., 1994).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos da ovariectomia e do tratamento sistêmico com RS na reparação de defeito ósseo em fêmures de ratas por meio de análises de imagens microtomográficas e nos componentes biomoleculares do osso cortical usando espectroscopia no infravermelho.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizadas 27 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) com noventa dias de idade, pesando em média duzentos e cinquenta gramas. As ratas foram ovariectomizadas (n= 18) ou submetidas a cirurgia *Sham* (n=9). Estes animais foram mantidos no Laboratório de Biologia Oral (LBO) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) em salas climatizadas a 22°C, com alteração de luz de 12/12 horas, alimentados com ração peletizada para ratos (Biobase®, Águas Frias, SC, Brasil) contendo 1% de cálcio, 0,8% de fósforo, e 5.000 UI/kg de vitamina D3. A água e a ração estavam disponíveis *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº134 (ANEXO A).

4.2 Procedimentos cirúrgicos

4.2.1 Anestesia

As ratas foram pesadas para calcular a dosagem ideal de anestésico a ser administrada para cada animal. Em todos os procedimentos cirúrgicos, foi utilizada para anestesia uma solução aquosa de cloridrato de xilazina a 2% (Rhobifarma, Hortolândia, SP, Brasil), substância sedativa analgésica e relaxante muscular e, cloridrato de cetamina a 10% (Rhobifarma, Hortolândia, SP, Brasil), anestésico geral, respectivamente, na proporção de 1,0 ml para 0,5 ml. A dosagem da solução injetada foi de 0,1 ml/100 g por via intramuscular, utilizando-se uma agulha e uma seringa descartáveis de 1 ml.

4.2.2 Ovariectomia e cirurgia *Sham*

Após a anestesia, foi realizada tricotomia da região lateral do corpo, ao nível dos rins e abaixo da costela mais inferior e antissepsia da pele com álcool iodado, por fricção com gaze estéril. Foi realizada uma incisão longitudinal com o uso de uma lâmina nº15 montada em bisturi, com extensão média de 1 cm na pele e na camada muscular. Após a exposição do ovário para fora da cavidade abdominal com o auxílio de uma pinça para algodão, procedeu-se uma amarra da vasculatura local com fio de algodão para contenção da hemorragia. Após este procedimento, foi excisado o ovário com parte do útero e tecidos moles adjacentes. As trompas foram então reposicionadas na cavidade abdominal e, em seguida, a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda 3.0 (Ethicon - Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) e foi realizada nova antissepsia na região operada com álcool iodado. Todos estes procedimentos foram realizados bilateralmente (Figura 4.1). Na cirurgia *sham* ou falsa ovariectomia, foram feitos os mesmos procedimentos, incluindo a exposição dos ovários, com exceção da remoção dos mesmos.

Figura 4.1 - Ovariectomia

4.2.3 Execução da lesão óssea

Após 30 dias da ovariectomia e da cirurgia *Sham*, foi realizado um defeito ósseo monocortical em todos os animais. Ele foi realizado, após a dissecação dos tecidos subcutâneos, na região de diáfise do fêmur esquerdo, na sua porção distal. Foi utilizada uma broca esférica carbide de 2,5 mm de diâmetro, nº 8, montada em motor elétrico na velocidade de 1500 rpm, sob irrigação constante com solução estéril de Cloreto de Sódio (NaCl 0,9%). A broca foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo do fêmur e o osso cortical foi cortado de forma circular. Após a confecção do defeito ósseo, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio de seda 3.0 (Ethicon - Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 4.2). Foi realizada antissepsia na região operada com álcool iodado.

Figura 4.2 - Confecção do defeito ósseo

4.3 Tratamento

O tratamento foi iniciado no dia seguinte à realização da lesão óssea. Todos os ratos ovariectomizados foram divididos aleatoriamente em dois grupos: OVZ (n=9) e RS (n=9). Os animais do grupo RS receberam o RS (Protos®, Servier, Gidy, França), 625 mg/kg/dia (Bain et al., 2009; Li et al., 2012), em suspensão aquosa, via oral, por gavagem. O fármaco foi diluído em água Milli-Q (Millipore, Molsheim, França) calculada para que a dose por animal correspondesse a 0,3 ml, a suspensão foi administrada imediatamente após ser preparada. Foi utilizada uma agulha de gavagem para ratos, de aço inox, curva, com 38 mm de comprimento, acoplada a uma seringa descartável de 1 ml, para que a solução fosse injetada diretamente no trato gastrointestinal (Figura 4.3). Semanalmente, os animais foram pesados em balança eletrônica para que a solução de RS fosse preparada com a dosagem adequada. O tempo de tratamento foi de quatro semanas. Os grupos OVZ e SHAM receberam água filtrada.

Figura 4.3 - Gavagem para administração do medicamento

4.4 Eutanásia dos animais e fixação das peças ósseas

Todos os animais foram submetidos à eutanásia por anestesia geral e posterior decapitação. Esta foi realizada decorridos quatro semanas da cirurgia do defeito ósseo. O fêmur esquerdo foi retirado e o tecido mole excedente foi removido.

Foi realizada uma raspagem superficial do osso cortical com lâmina de bisturi próxima ao defeito para obtenção de amostras para as espectroscopias, as quais foram congeladas e posteriormente liofilizadas por 24 horas. Já as peças ósseas foram fixadas em uma solução de formaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,01M.

O béquer contendo os espécimes imersos na solução fixadora foi posicionado no centro de uma forma de vidro contendo gelo picado, e o conjunto foi levado a um forno de microondas Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, CA, USA). Um termômetro foi imerso na solução fixadora durante a operação do forno a fim de monitorar a temperatura da mesma, a qual não ultrapassou os 37°C. Os espécimes foram expostos a 3 ciclos de 5 minutos e após esse processo, foram imersos em uma nova solução fixadora (Massa; Arana-Chaves, 2000; Arana-Chaves; Nanci, 2001).

4.5 Verificação dos efeitos da ovariectomia

Para a verificação dos efeitos da ovariectomia foi feita uma inspeção visual para observar a atrofia uterina (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Exemplo de útero de uma rata que sofreu cirurgia *Sham*, mostrando dimensões normais e exemplos de úteros mostrando atrofia, provenientes de ratas ovariectomizadas (OVZ e RS)

4.6 Análise dos resultados

4.6.1 Análise por microtomografia computadorizada

A avaliação do reparo do defeito ósseo nos fêmures por μ CT foi realizada no laboratório 3D Bio localizado no Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, utilizando-se o microtomógrafo modelo 1172 (Skyscan, Bélgica) e os *softwares* NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo, compreendendo as seguintes etapas:

- a) Escaneamento microtomográfico dos fêmures excisados com os seguintes parâmetros: fonte de raios-X operando com 60 kV e 165 μ A, filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura, rotação de 180° com incremento angular de 0,6°, aquisição com câmera CCD de 11 Mp, 8 projeções radiográficas em cada rotação e resolução de 5 μ m.
- b) Reconstrução microtomográfica dos fêmures pelo *software* NRecon.
- c) Visualização coronal, transversal e sagital através do *software* Dataviewer (Figura 4.5), foi criado um *dataset* a partir da vista sagital para análise da reparação óssea.

Figura 4.5 – *Software* Dataviewer exibindo os cortes na vistas coronal, transversal e sagital

d) Escolha de uma região de interesse do objeto (ROI), na vista sagital, com formato circular de 232 pixel de diâmetro através do programa CT-Analyzer (Figura 4.6).

e) Criação de um volume de interesse (VOI) a partir do ROI. Foram utilizados 160 cortes (*slices*) do fêmur para compor o VOI. Foi escolhido este valor por ser o número máximo de cortes em que o VOI não invadiria o osso cortical das amostras, o que poderia alterar os resultados do estudo.

Figura 4.6 – Software CT-Analyzer (CTAn) Mostrando o ROI circular de 232 pixel de diâmetro

f) Visualização 2D e binarização das reconstruções microtomográficas através do software CT-Analyzer. Foram utilizados os seguintes *thresholds* mínimo e máximo: 72 e 187.

g) Após a segmentação os seguintes parâmetros foram quantificados dentro do VOI: volume ósseo (BV), volume ósseo relativo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th), e a separação das trabéculas (Tb.Sp) utilizando-se o software CT-Analyzer.

h) Visualização 3D do VOI através do software CT-Vol (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Visualização 3D do VOI a partir do *software* CT-Vol

4.6.2 Espectroscopia no infravermelho

Essa análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), na cidade de São José dos Campos- SP.

Foram confeccionadas pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) com a concentração de 1 mg de tecido ósseo em 150 mg de KBr. Para confeccionar as pastilhas cada amostra foi macerada juntamente com KBr (Figura 4.8-a) e depois prensadas (Figura 4.8-b).

Foram obtidos espectros de cada amostra na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , no modo de transmissão, com 12 varreduras a temperatura controlada (18 a 20°C). O espectrofotômetro utilizado foi o Spectrum GX FT-IR (PerkinElmer, EUA) (Figura 4.8-c). Os espectros foram pré-processados com o *software* Spectrum 5.2 (PerkinElmer, EUA), onde foram feitas as correções de linha de base e normalização. As análises foram realizadas com o espectro em absorbância.

Os parâmetros analisados foram: índice de cristalinidade, relação de material inorgânico sobre o orgânico, maturação de colágeno e alterações de estruturas secundárias de proteínas.

Figura 4.8 - Confeção das pastilhas de KBr (a-c) e o espectrofotômetro (d)

4.6.2.1 Índice de cristalinidade

O índice de cristalinidade (IC) é uma medida para avaliar mudanças nos cristais da HA. Para calcular este índice foram utilizados dois métodos:

a) Cálculo do IC usando a fórmula:

$$IC = \frac{I_{603\text{cm}^{-1}} + I_{562\text{cm}^{-1}}}{I_{589\text{cm}^{-1}}}$$

onde I é a intensidade de absorbância em determinado comprimento de onda.

Para realizar este procedimento é necessário desenhar uma linha de base no espectro de 400 cm^{-1} a 635 cm^{-1} . As bandas localizadas em 603 cm^{-1} e 562 cm^{-1} correspondem à modos de deformação do grupamento PO_4^{-3} ($\nu_4\text{ PO}_4^{-3}$). Quanto menor for a largura dessas bandas menor será a intensidade em $I_{589\text{ cm}^{-1}}$ maior será

o IC (Veloso, 2013).

b) Ajuste de curva na região de 1200-900 cm^{-1} . Essa região do espectro contém modos de estiramento simétrico ν_1 e assimétrico ν_3 do grupamento PO_4^{-3} . Esse ajuste foi realizado no programa Origin Pro 8.0 (Origin®, Northampton, MA, EUA) usando o espectro médio e função gaussiana com seis pontos. O IC foi calculado pela razão das áreas das bandas em 1057 e 1023 cm^{-1} (Pleshko et al., 1991).

4.6.2.2 Razão das intensidades das bandas de material inorgânico (fosfato) pelo orgânico (amida I).

Razão das intensidades das bandas em 1035 ($\nu_1 \text{PO}_4^{-3}$) e 1656 cm^{-1} ; isto é, a razão das intensidade das bandas de material inorgânico (banda de fosfato) e orgânico (amida I) (Rochkind et al., 2004).

$$\frac{I_{1035}}{I_{1656}}$$

4.6.2.3 Razão das áreas das bandas de fosfato (inorgânico) e material orgânico

O cálculo da razão da área das bandas de fosfato (inorgânico) e material orgânico do tecido ósseo foi dividido em duas partes:

a) Razão da área integrada da banda de fosfato (1180-905 cm^{-1}) pela área integrada da banda de amida I + amida II (1721-1520 cm^{-1}) (Gourion-Arsiquaud et al., 2009; Veloso, 2013).

$$\frac{A_{1180-905}}{A_{1721-1520}}$$

b) Razão da área integrada da banda de fosfato (1180-905 cm^{-1}) pela área integrada da banda de amida III (1270-1210 cm^{-1}) somada das duas bandas correspondentes às estruturas de colágeno (1296-1269 cm^{-1}) e (1213-1180 cm^{-1}) (Veloso, 2013).

$$\frac{A_{1180-905}}{A_{1296-1269} + A_{1270-1210} + A_{1213-1180}}$$

4.6.2.4 Ajuste de curva da banda de amida I

A maturação do colágeno foi estimada pela razão das áreas das sub-bandas de amida I localizadas em 1660 cm^{-1} e 1690 cm^{-1} obtidas com ajuste de curva (Paschalis et al., 2001). O ajuste de curva da banda de amida I foi realizado no programa Origin Pro 8.0 (Origin®, Northampton, MA, EUA), com base nas informações de posição fornecidas pela segunda derivada. Esta foi utilizada para identificar o ponto de máximo dos principais componentes da amida I. O controle do ajuste foi realizado pelos valores de χ^2 (qui-quadrado) e coeficiente de correlação. Esse ajuste foi realizado usando o espectro médio e função gaussiana com cinco pontos.

4.6.2.5 Ajuste de curva da banda de amida III

A estrutura secundária de proteínas pode ser estimada usando a região de amida III (1350-1200 cm^{-1}) no espectro (Fu et al., 1994). O ajuste de curva da banda de amida III foi realizado no programa Origin Pro 8.0 (Origin®, Northampton, MA, EUA), com base nas informações de posição fornecidas pela deconvolução e segunda derivada. O controle de ajuste foi realizado pelos valores de χ^2 (qui-quadrado) e coeficiente de correlação. Esse ajuste foi realizado usando o espectro médio e função gaussiana com quatro pontos.

4.6.2.6 Razão das áreas das bandas de colágenos pela amida III

A razão das duas bandas correspondentes às estruturas de colágeno (1296-1269 cm^{-1}) e (1213-1180 cm^{-1}) pela amida III. Essa relação foi utilizada para avaliar se houve variação na quantidade de colágenos entre os grupos.

$$\frac{A_{1296-1269} + A_{1213-1180}}{A_{1270-1210}}$$

4.6.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

O EDS (energy dispersive x-ray detector, EDX ou EDS) é um acessório do MEV essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Como cada elemento químico tem estrutura atômica única, os raios-x emitidos são característicos de cada estrutura, o que permite identificar a composição da amostra.

A presença ou não do Sr incorporado ao tecido ósseo no grupo RS e a quantidade de Ca e fósforo (P) presentes nas amostras de tecido ósseo de todos os grupos foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio modelo EVO-MA40 (Zeiss), com EDS. Essa análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da UNIVAP, na cidade de São José dos Campos- SP. Para a realização da análise por EDS, as amostras liofilizadas foram colocadas sob uma fita adesiva de carbono de dupla face e observadas sem qualquer revestimento (Figura 4.9). A figura 4.10 mostra as imagens obtidas das amostras.

Figura 4.9 - Suporte com as amostras e Máquina de MEV/EDS (modelo EVO-MA40)

Figura 4.10 - Imagens obtidas via MEV/EDS das amostras: a) SHAM; b) OVZ; c) RS

4.8 Análises estatísticas

As variáveis foram descritas por meio de estatísticas de posição (média, mediana, mínimo, máximo) e escala (desvio padrão, intervalo interquartis) para cada grupo (Bussab; Morettin, 2006). Avaliaram-se as comparações das médias entre eles por um modelo linear simples (ANOVA de um fator) (Neter et al., 1996). Quando o efeito se mostrou significativo, realizaram-se comparações múltiplas pelo método de Tukey. Quando a suposição de normalidade dos resíduos ou homogeneidade das variâncias, exigida pela ANOVA, não foram atendidas, testou-se o efeito dos grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (Hollander; Wolfe, 1973).

Para as variáveis (IC, I Fosfato/I Amida I, A Fosfato/A Amida I + II, A Fosfato/A colágeno + A Amida III, A colágenos/A Amida III, P, Ca e Sr) das análises por espectroscopias o número de ratos observados foi 5 por grupo. Para esses casos, todas as análises foram apresentadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Foram construídos gráficos de caixa (*boxplots*) para o auxílio das interpretações dos resultados e ajustes dos modelos utilizando-se o pacote *ggplot2* (Wickham, 2009). Os testes foram interpretados considerando um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com auxílio do *software* R 3.1.0 (R Core Team, 2014).

5 RESULTADOS

5.1 Microtomografia computadorizada

A figura 5.1 mostra reconstruções microtomográficas do reparo do defeito ósseo de um animal de cada grupo experimental. Observa-se que no animal do grupo SHAM a reparação óssea aparenta estar numa fase mais avançada.

Figura 5.1 - Imagens 2-D μ CT de cortes transversais, coronais e sagitais (direita → esquerda) da região central do defeito ósseo; grupo OVZ (a), grupo RS (b) e grupo SHAM (c)

A tabela 5.1 apresenta estatísticas descritivas de todas as variáveis por grupo.

Tabela 5.1 - Estatísticas descritivas por grupo

Variável	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil
BV pixel³ (mil)	Todos	27	1015,4	3105,8	1951,1	452,3	1945,6	1672,4	2289,3
	OVZ	9	1178,9	2424,1	1724,7	360,4	1711,3	1527,4	1844,2
	RS	9	1015,4	2407,8	1835,4	419,2	1797,5	1663,2	2154,6
	SHAM	9	1743,6	3105,8	2293,3	393,4	2320,4	2051,5	2461,3
	Todos	27	15,0	45,5	28,7	6,6	28,7	24,9	33,7
BV/TV (%)	OVZ	9	17,3	35,5	25,5	5,3	25,3	22,6	27,2
	RS	9	15,0	35,0	27,0	6,1	26,3	24,4	31,8
	SHAM	9	25,8	45,5	33,7	5,7	34,0	30,3	36,3
	Todos	27	5,68	10,91	8,09	1,47	8,08	6,79	9,50
Tb.Th (pixel)	OVZ	9	5,68	8,15	7,08	0,81	7,21	6,74	7,66
	RS	9	6,23	9,92	8,65	1,34	9,33	8,26	9,60
	SHAM	9	6,17	10,91	8,54	1,69	9,47	6,84	9,61
	Todos	27	0,024	0,070	0,036	0,010	0,036	0,030	0,038
Tb.N (1/pixel)	OVZ	9	0,024	0,049	0,036	0,007	0,037	0,033	0,040
	RS	9	0,024	0,039	0,031	0,005	0,031	0,027	0,036
	SHAM	9	0,026	0,070	0,041	0,014	0,038	0,033	0,046
	Todos	27	18,0	43,7	29,3	7,2	27,8	24,2	33,1
Tb.Sp (pixel)	OVZ	9	18,0	30,8	24,8	5,0	24,0	20,3	29,6
	RS	9	24,6	40,4	31,8	5,7	31,4	27,0	33,5
	SHAM	9	20,4	43,7	31,4	8,7	27,8	24,4	37,9

Já a tabela 5.2 mostra a média e o desvio padrão por grupo e apresenta o teste F da ANOVA, que indica ao nível de significância estipulado se há efeito do grupo na distribuição da variável em questão.

Há efeito significativo para BV pixel³ (mil), BV/TV (%) e Tb.Th (pixel) ($p < 0,05$). Já as Tb.N (1/pixel) e Tb.Sp (pixel) não apresentaram efeitos significativos ($p = 0,092$ e $0,061$).

Tabela 5.2 - Comparações entre médias das variáveis por grupo

Variável	OVZ (n=9)		RS (n=9)		Sham (n=9)		Total (n=27)		Valor p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
BV pixel ³ (mil)	1724,7	360,41	1835,4	419,2	2293,3	393,38	1951,1	452,3	0,012
BV/TV (%)	25,51	5,26	26,98	6,12	33,69	5,73	28,73	6,58	0,013
Tb.Th (pixel)	7,08	0,81	8,65	1,34	8,54	1,69	8,09	1,47	0,034
Tb.N (1/pixel)	0,04	0,01	0,03	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,092
Tb.Sp (pixel)	24,8	4,97	31,81	5,66	31,4	8,72	29,34	7,18	0,061

(1) Teste F da ANOVA

Os gráficos 5.1 a 5.5 são representações da distribuição amostral por grupo, eles servem para nos indicar também que a distribuição das variáveis é aparentemente simétrica, com exceção dos gráficos 5.4 e 5.5, para Tb.N e Tb.Sp. Nessas variáveis para o grupo SHAM há aparentemente casos mais extremos (inferiores), o que pode nos indicar que a suposição de homogeneidade das variâncias pode não estar satisfeita. Para esses casos, também se ajustou modelos não-paramétricos de Kruskal-Wallis. Porém, o resultado se manteve. Em ambos não podemos dizer que há evidências suficientes para dizer que a média seja diferente em algum dos grupos.

Gráfico 5.1 - Boxplots para BV pixel³ (mil) por grupo

Gráfico 5.2 - *Boxplots* para BV/TV (%) por grupo

Gráfico 5.3 - *Boxplots* para Tb.N (1/pixel) por grupo

Gráfico 5.4 - *Boxplots* para Tb.Sp (pixel) por grupo

Gráfico 5.5 - *Boxplots* para Tb.Th (pixel) por grupo

Uma vez que os efeitos para BV, BV/TV e Tb.Th ($p < 0,05$) foram significativos, realizaram-se comparações múltiplas de Tukey com valor de p ajustado para identificar quais diferenças duas a duas foram significativas.

O gráfico 5.6 mostra as comparações para BV. Diz-se que o grupo SHAM apresenta em média BV pixel cerca de 550 mil pixel³ superior ao grupo OVZ ($p=0,014$). Já a comparação entre SHAM e RS possui diferenças limítrofes com diferença média de cerca de 500 mil pixel³ superior no grupo SHAM ($p=0,052$).

Gráfico 5.6 – Comparações múltiplas de Tukey para BV pixel³ (mil) entre grupos

O gráfico 5.7 faz a comparação para a variável BV/TV. A diferença média significativa ocorre entre SHAM e OVZ (cerca de 8%, $p = 0,015$). E a comparação entre SHAM e RS é limítrofe.

Gráfico 5.7 – Comparações múltiplas de Tukey para BV/TV (%) entre grupos

A diferença para Tb.Th, porém, ocorre entre os grupo RS e OVZ. O primeiro é cerca de 1,8%, em média, superior ao segundo ($p = 0,049$). Há um efeito limítrofe entre SHAM e OVZ e não há evidências de que SHAM e RS difiram em média.

Gráfico 5.8 – Comparações múltiplas de Tukey para Tb.Th entre grupos

A tabela 5.3 apresenta os valores exatos das comparações múltiplas apresentadas nos gráficos 5.6 a 5.8.

Tabela 5.3 - Comparações múltiplas de Tukey por grupo para os modelos com efeito significativo

Variável	Comparação	Diferença estimada	IC para dif (95%)		valor p ajustado
			Inf	Sup	
BV pixel ³ (mil)	RS-OVZ	111	-350,5	572	p=0,822
	SHAM-OVZ	569	107,5	1030	p=0,014
BV/TV (%)	SHAM-RS	458	-3,2	919	p=0,052
	RS-OVZ	1,5	-5264	8,2	p=0,851
	SHAM-OVZ	8,2	1441	14,9	p=0,015
	SHAM-RS	6,7	-0,025	13,4	p=0,051
Tb.Th (pixel)	RS-OVZ	1,6	0,0036	3,1	p=0,049
	SHAM-OVZ	1,5	-0,1001	3	p=0,07
	SHAM-RS	-0,1	-16691	1,5	p=0,985

5.2 Espectroscopia no infravermelho

Na figura 5.2 são apresentados os espectros médios de cada grupo experimental. Para comparação, os espectros foram sobrepostos no mesmo gráfico. Observa-se que os espectros dos grupos são semelhantes. Assim, é necessário, muitas vezes, recorrer pelos métodos matemáticos e estatísticos para se obter algumas informações estruturais muito complexas em sistemas biológicos.

As tabelas 5.4 e 5.5 apresentam estatísticas descritivas das variáveis. A Tabela 5.5 apresenta o valor de p da comparação global da variável segundo o grupo pelo teste de Kruskal-Wallis.

Figura 5.2 - Espectros FTIR dos grupos SHAM, RS e OVZ

Tabela 5.4 - Estatísticas descritivas por grupo

Variável	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mediana	1º quartil	3º quartil
IC (603-562 cm ⁻¹)	Todos	15	2,91	2,98	2,94	0,02	2,94	2,92	2,96
	OVZ	5	2,91	2,97	2,94	0,02	2,95	2,94	2,95
	RS	5	2,92	2,96	2,95	0,02	2,96	2,94	2,96
	SHAM	5	2,91	2,98	2,93	0,03	2,92	2,92	2,93
I Fosfato (1035) // Amida I (1656)	Todos	15	2,74	3,40	3,03	0,18	3,00	2,91	3,13
	OVZ	5	2,88	3,40	3,08	0,20	3,01	2,99	3,13
	RS	5	2,93	3,26	3,08	0,15	3,00	2,97	3,23
	SHAM	5	2,74	3,14	2,94	0,18	2,88	2,80	3,12
A Fosfato / A Amida I e II	Todos	15	3,63	4,32	3,99	0,22	4,01	3,83	4,10
	OVZ	5	3,68	4,32	4,05	0,27	4,00	3,96	4,31
	RS	5	4,01	4,21	4,09	0,09	4,05	4,03	4,13
	SHAM	5	3,63	4,06	3,82	0,20	3,69	3,69	4,01
A Fosfato/A colágeno + A Amida III	Todos	15	15,54	24,74	19,04	2,54	18,58	17,56	19,67
	OVZ	5	16,93	24,74	19,39	3,09	18,75	17,76	18,77
	RS	5	15,54	23,32	19,29	3,16	18,58	17,36	21,63
	SHAM	5	16,00	20,18	18,45	1,54	18,51	18,40	19,17
A Colágeno/A Amida III	Todos	15	0,97	1,08	1,04	0,03	1,04	1,02	1,06
	OVZ	5	0,97	1,07	1,04	0,04	1,06	1,05	1,07
	RS	5	1,00	1,08	1,04	0,03	1,03	1,02	1,06
	SHAM	5	1,01	1,06	1,03	0,02	1,03	1,02	1,04

A Fosfato - 1180-905 cm⁻¹; A Amida I+II - 1721-1520 cm⁻¹; A colágeno - 1296-1269 cm⁻¹ + 1213-1180 cm⁻¹; A Amida III - 1270-1210 cm⁻¹.

Tabela 5.5 - Comparações entre médias das variáveis por grupo

Variável	OVZ (n=5)		RS (n=5)		SHAM(n=5)		Total (n=15)		Valor p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
IC (603-562 cm ⁻¹)	2,94	0,02	2,95	0,01	2,93	0,03	2,94	0,02	0,401
I Fosfato // Amida I	3,08	0,2	3,08	0,15	2,94	0,18	3,03	0,18	0,403
A Fosfato/A Amida I e II	4,05	0,27	4,09	0,08	3,82	0,2	3,98	0,22	0,23
A Fosfato/A colágeno + A Amida III	19,39	3,09	19,29	3,16	18,45	1,54	19,04	2,54	0,961
A Colágeno/A Amida III	1,04	0,04	1,04	0,03	1,03	0,02	1,04	0,03	0,632

(1) Teste de Kruskal-Wallis

Os Gráficos 5.9 a 5.13 são as representações em *boxplot* das variáveis segundo os Grupos.

Gráfico 5.9 - *Boxplots* para IC por grupo

Gráfico 5.10 - *Boxplots* para I Fosfato/I Amida I por grupo

Gráfico 5.11 - *Boxplots* para A Fوسفato/A Amida I e II por grupo

Gráfico 5.12 - *Boxplots* para A Fوسفato/A colágeno + A Amida III por grupo

Gráfico 5.13 - *Boxplots* para A Colágeno/A Amida III por grupo

5.2.1 Índice de cristalinidade

O IC calculado pela fórmula $IC = \frac{I_{603\text{cm}^{-1}} + I_{562\text{cm}^{-1}}}{I_{589\text{cm}^{-1}}}$ não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,401$). Já na análise com ajuste de curva na região de $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, a razão das áreas das sub-bandas em 1057 e 1023 cm^{-1} foi 1,024 no grupo SHAM, 1,015 no grupo RS e 1,108 no grupo OVZ. As figuras 5.3, 5.4 e 5.5 mostram o ajuste de curva.

Figura 5.3 - Ajuste de curva na região 1200-900 cm^{-1} , grupo OVZ

Figura 5.4 - Ajuste de curva na região 1200-900 cm^{-1} , grupo SHAM

Figura 5.5 - Ajuste de curva na região 1200-900 cm^{-1} , grupo RS

5.2.2 Razão das intensidades das bandas de material inorgânico (fosfato) pelo orgânico (amida I)

A razão das intensidades das bandas em 1035 cm^{-1} (fosfato) e 1656 cm^{-1} (amida I) não mostrou diferença significativa ($p=0,403$) entre os grupos como mostra na Tabela 5.5.

5.2.3 Razão das áreas de bandas de fosfato e material orgânico

As duas formas utilizadas para calcular a razão da área da banda de fosfato pelo material orgânico presente no osso não apresentaram diferenças significativas: A fosfato (1180-905 cm^{-1}) / A amida I + II (1721-1520 cm^{-1}) ($p=0,23$) e A fosfato (1180-905 cm^{-1}) / A colágeno + A Amida III (1296-1269 cm^{-1} + 1213-1180 cm^{-1}) + (1270-1210 cm^{-1}) ($p=0,96$) (Tabela 5.5).

5.2.4 Ajuste de sub-bandas de amida I

As figuras 5.6, 5.7 e 5.8 mostram espectros FTIR com suas bandas subjacentes resolvidas por técnicas de segunda derivada e de ajuste de curva. A relação PYR/DHLNL foi 3,502 no grupo SHAM, 3,355 no grupo OVZ e 2,514 no grupo RS.

Figura 5.6 - Sub-bandas de amida I ajustadas, grupo SHAM

Figura 5.7 - Sub-bandas de amida I ajustadas, grupo OVZ

Figura 5.8 - Sub-bandas de amida I ajustadas, grupo RS

5.2.5 Ajuste de sub-bandas de amida III

Os resultados do ajuste de curva para os três grupos são mostrados no gráfico 5.14. As frações das áreas dos componentes de amida III são mostrados nas tabelas 5.6, 5.7 e 5.8. As figuras 5.9, 5.10 e 5.11 mostram espectros FTIR com suas bandas subjacentes resolvidas pelas técnicas de deconvolução, segunda derivada e ajuste de curva.

Tabela 5.6 – Análise da banda de amida III, grupo Sham

Grupo SHAM		
Número de onda (cm ⁻¹)	Área relativa (%)	
1340	19,2	α-hélice
1277	14,7	Random Coil (RC)
1229 e 1245	66,1	β-sheet

Tabela 5.7 – Análise da banda de amida III, grupo OVZ

Grupo OVZ		
Número de onda (cm ⁻¹)	Área relativa (%)	
1340	12,8	α-hélice
1277	7,8	Random Coil (RC)
1229 e 1245	79,4	β-sheet

Tabela 5.8 – Análise da banda de amida III, grupo RS

Grupo RS		
Número de onda (cm ⁻¹)	Área relativa (%)	
1340	13,6	α-hélice
1277	7,8	Random Coil (RC)
1229 e 1245	78,5	β-sheet

Figura 5.9 – Sub-bandas de amida III ajustadas, grupo SHAM

Figura 5.10 – Sub-bandas de amida III ajustadas, grupo OVZ

Figura 5.11 – Sub-bandas de amida III ajustadas, grupo RS

Gráfico 5.14 - Porcentagem estimada das estruturas secundárias das proteínas nos grupos SHAM, OVZ e RS

5.2.6 Razão das áreas das bandas de colágenos pela amida III

A razão das áreas das bandas correspondentes às estruturas de colágenos ($1296-1269\text{ cm}^{-1}$) e ($1213-1180\text{ cm}^{-1}$) pela amida III ($1270-1210\text{ cm}^{-1}$) não mostrou diferença significativa ($p=0,632$) entre os grupos como mostra na Tabela 5.5

5.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

As amostras dos três grupos apresentaram como seus principais constituintes os elementos químicos P e Ca (Figuras 5.12-5.14). Na figura 5.14 é possível observar um pico menor para o elemento Ca em uma amostra do grupo RS.

Figura 5.12 - Espectro de EDS de uma amostra do grupo SHAM

Figura 5.13 - Espectro de EDS de uma amostra do grupo OVZ

Figura 5.14 - Espectro de EDS de uma amostra do grupo RS

As tabelas 5.9 e 5.10 apresentam estatísticas descritivas. A tabela 5.10 apresenta o valor de p da comparação global da variável segundo o grupo pelo teste de Kruskal-Wallis. Os elementos Ca e Sr se destacaram como variáveis influenciadas pelo tratamento (ambos = 0,009).

Tabela 5.9 - Estatísticas descritivas por grupo

Variável	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mediana	1º Quartil	3º quartil
P	Todos	15	7,37	40,10	22,76	8,81	21,79	17,56	28,02
	OVZ	5	7,37	32,28	21,20	8,92	21,79	21,46	23,11
	RS	5	13,60	27,09	20,20	5,82	19,24	15,88	25,18
	SHAM	5	11,48	40,10	26,88	11,21	28,95	20,36	33,49
Ca	Todos	15	32,91	112,48	69,95	21,49	71,24	56,47	77,76
	OVZ	5	64,39	102,52	81,40	15,00	79,80	71,24	89,04
	RS	5	32,91	59,67	47,42	11,02	52,13	39,15	53,26
	SHAM	5	68,45	112,48	81,02	17,83	75,67	72,80	75,71
Sr	Todos	15	-0,29	2,76	0,57	0,76	0,30	0,12	0,90
	OVZ	5	-0,23	0,70	0,18	0,34	0,18	0,04	0,21
	RS	5	0,86	2,76	1,36	0,79	1,05	0,94	1,21
	SHAM	5	-0,29	0,62	0,17	0,33	0,13	0,10	0,30

Tabela 5.10 - Comparações entre médias das variáveis por grupo

Variável	OVZ (n=5)		RS (n=5)		SHAM (n=5)		Total (n=15)		Valor p ¹
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
P	21,2	8,92	20,2	5,82	26,88	11,21	22,76	8,81	0,512
Ca	81,4	15	47,42	11,01	81,02	17,83	69,95	21,48	0,009
Sr	0,18	0,34	1,36	0,79	0,17	0,33	0,57	0,76	0,009

(1) Teste de Kruskal-Wallis.

Os gráficos 5.15 a 5.17 são as representações em *boxplot* das variáveis segundo os grupos.

Gráfico 5.15 - *Boxplots* para P por grupo

Gráfico 5.16 - *Boxplots* para Ca por grupo

Gráfico 5.17 - *Boxplots* para Sr por grupo

Os elementos Ca e Sr apresentaram diferenças significativas segundo o teste de Kruskal-Wallis, realizaram-se comparações múltiplas com valor de p ajustado para identificar quais diferenças duas a duas foram significativas. A tabela 5.11 apresenta as diferenças médias estimadas pela ANOVA usual, mas os valores de p ajustado se referem ao teste não paramétrico.

Tabela 5.11 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis por grupo para os modelos com efeito significativo

Variável	Comparação	Diferença estimada	IC para dif (95%)		valor p ajustado ¹
			Inf	Sup	
Ca	RS-OVZ	-33,97	-59,1	-8,9	p=0,027
	SHAM-OVZ	-0,38	-25,5	24,7	p=0,998
	SHAM-RS	33,6	8,5	58,7	p=0,033
Sr	RS-OVZ	1184	0,29	2,08	p=0,033
	SHAM-OVZ	-0,008	-0,91	0,89	p=0,998
	SHAM-RS	-1192	-2,09	-0,29	p=0,027

(1) Teste de Kruskal-Wallis

Em ambas as medidas, conclui-se, ao nível de significância de 5%, que o RS possui níveis de Ca e Sr diferentes dos demais, como sugerem os gráficos 5.18 e 5.19.

Gráfico 5.18 – Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e intervalos de confiança paramétricos para Ca entre grupos

Gráfico 5.19 – Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e intervalos de confiança paramétricos para Sr entre grupos

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a ovariectomia prejudicou a microarquitetura óssea e a qualidade deste tecido, que é consistente com resultados publicados em outros trabalhos usando este modelo de estudo (Fuchs et al., 2008; Bain et al., 2009; Li et al., 2010). Os animais ovariectomizados apresentaram as menores médias em relação a quase todos os parâmetros morfológicos analisados por μ CT. O tratamento com RS melhorou estes parâmetros morfológicos. O RS é capaz de prevenir a perda óssea trabecular induzida pela deficiência estrogênica em ratas e de estabilizar a osteopenia neste modelo experimental (Marie, 2005).

A microarquitetura óssea foi marcadamente diferente entre os grupos experimentais, exceto Tb.N ($p=0,092$) e Tb.Sp ($p=0,061$) (Tabela 5.2). Assim, podemos dizer que a microarquitetura óssea não diferiu em termos de topologia, isto é Tb.N manteve-se constante. O grupo RS apresentou valores intermediários para as variáveis BV e BV/TV, mas foi caracterizado por um aumento significativo na variável Tb.Th em relação ao grupo OVZ. Dados semelhantes foram observados em outro estudo utilizando modelo de fratura de tíbia, 4 semanas pós-fratura o tratamento com RS aumentou significativamente os valores de BV, TV, Tb.Th, Tb.N e BV/TV comparado com o grupo OVZ não tratado (Li et al., 2010). O Sr é capaz de prevenir as mudanças no *turnover* ósseo induzidas pela deficiência estrogênica (Morohashi et al., 1995). Assim, no período inicial da reparação óssea a inibição da reabsorção óssea excessiva e a promoção da formação óssea pelo RS podem ter contribuído para esses resultados.

A terapêutica com RS apresentou ser bem tolerada e segura, não foi observado nenhum efeito adverso nos animais que receberam a medicação. Isto também foi notado em uma publicação prévia em que os autores observaram que o tratamento de ratos com 125, 250, ou 625 mg/kg/dia de RS não apresentou efeitos adversos e não teve efeito sobre o ganho de peso corporal nos animais (Bain et al., 2009).

Os animais receberam ração com concentração normal de Ca (1%) e isto é necessário para adequada interpretação terapêutica, já que os níveis séricos de Sr e os níveis de Sr no osso subsequentes são influenciados pelos níveis de Ca na dieta

(Fuchs et al., 2008). Além disso, a incorporação do Sr na matriz mineralizada é dependente de dosagem. Assim, dietas ricas em cálcio podem necessitar de um ajuste de dosagem do medicamento. A dosagem utilizada de RS foi 625 mg/kg/dia, essa dose administrada em animais alimentados com dieta normal de Ca pode levar a uma concentração sérica de Sr próxima às observadas em pacientes tratados com a dose terapêutica de 2g/dia (Bain et al., 2009; Li et al., 2010). Fuchs et al. (2008) estudaram doses mais baixas, 25 e 150 mg/kg/dia, de RS e observaram que nessas doses não houve aumento da formação de osso trabecular nem de superfície óssea periosteal e o medicamento falhou na inibição da reabsorção do osso trabecular. A ausência de efeito de tais doses de RS mostra a importância da utilização de uma dosagem apropriada para que o fármaco possa ser eficaz no osso.

O RS foi administrado em suspensão aquosa, via oral, no entanto, os animais não foram privados de alimento, mas a gavagem foi realizada no período da manhã para diminuir a possibilidade da ração dificultar a absorção do Sr, sendo que os ratos possuem hábitos noturnos e alimentam-se quase sempre à noite.

Na análise com EDS observou-se a incorporação de Sr nas amostras ósseas do grupo RS. Essa incorporação de Sr foi relatado ocorrer principalmente em tecido ósseo neoformado durante o tratamento com o RS (Boivin et al., 2010). O Sr é preferencialmente distribuído no osso trabecular por ser uma região mais ativa em comparação ao osso cortical. No entanto, o Sr não se acumula no osso e é rapidamente eliminado com a retirada do tratamento (Marie et al., 2011). Com relação a concentração de Ca na matriz mineralizada, o grupo RS apresentou a menor média quando comparado aos outros grupos (Tabela 5.10). Isto pode ter ocorrido devido a absorção de Sr por cristais minerais dos ossos poder ser através de trocas iônicas na superfície ou pela substituição de íons Ca por íons de Sr no osso formado (Boivin; Meunier, 2003; Farlay et al., 2005).

Embora a eficácia do RS como tratamento para osteoporose é bem documentada na literatura não há dados suficientes que mostrem que os efeitos do medicamento no osso podem estar relacionados, em parte, a alterações nas propriedades da matriz, e não foram encontrados trabalhos que avaliem a composição química do osso formado durante o tratamento.

As propriedades do osso que determinam a sua resistência mecânica são sua geometria e suas propriedades materiais, que incluem elementos orgânicos e

minerais da matriz, a atividade celular e a distribuição e tamanhos dos cristais. A maior parte destas propriedades dos materiais com exceção da atividade celular pode ser determinada por espectroscopia de infravermelho (Boskey et al., 2006).

O estudo da química do osso é dificultado pelo fato de que as regiões de osso trabecular e cortical respondem de forma diferente as doenças e medicamentos (Huang et al., 2003). Neste estudo foi utilizada a técnica de FTIR com pastilhas de KBr feitas com raspas de tecido ósseo da superfície cortical devido à dificuldade técnica para obtenção de raspas de osso trabecular. O número de amostras para as espectroscopias foi reduzido para $n=5$, pois as pastilhas feitas em épocas diferentes mostraram diferenças bruscas nos espectros, possivelmente, ocasionadas pela deterioração do tecido, por segurança foram utilizadas apenas as pastilhas feitas na mesma época em que os animais haviam sido sacrificados para não haver interferências nos resultados. Para as variáveis das espectroscopias todas as análises estatísticas foram apresentadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Avaliamos o IC por meio de duas técnicas, uma delas a relação das intensidades das bandas em $603\text{-}562\text{ cm}^{-1}$ pela 589 cm^{-1} não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p=0,401$) (Tabela 5.5). Já o IC avaliado pela técnica de ajuste de curva na região de $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, a razão das áreas em 1057 e 1023 cm^{-1} foi 1,024 no grupo SHAM, 1,015 no grupo RS e 1,108 no grupo OVZ, ou seja, neste grupo houve um aumento deste índice (cerca de 10%). Já o grupo RS apresentou valor próximo ao grupo SHAM, indicando que o tratamento manteve a cristalinidade do osso próximo ao do grupo controle e isto é benéfico para o tecido, pois estudos mostram que um aumento deste índice em osso osteoporótico está relacionado com a fragilidade do mesmo (Paschalis et al., 1997; Boskey; Mendelsohn, 2005). O aumento da cristalinidade do osso aumenta o risco de fraturas (Gourion-Arsiquaud et al., 2009).

As relações que avaliam componentes inorgânicos sobre orgânicos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5.5). Paschalis et al. (1997) fizeram análises de FTIR em biópsias de crista ilíaca de pacientes com osteoporose e compararam os dados com o osso normal. A relação de mineral sobre a matriz orgânica não apresentou diferença significativa entre o osso osteoporótico e o normal, mas a cristalinidade foi maior no osso osteoporótico. Os autores discutem que isto pode ser devido a um desequilíbrio do processo de

remodelamento ósseo, que ocorre na osteoporose. A baixa taxa de formação óssea pode favorecer a maturação do mineral existente. Já Huang et al. (2003) trabalharam com macacas ovariectomizadas e observaram um aumento da relação de fosfato sobre amida I no osso cortical formado após a ovariectomia, enquanto que o osso trabecular não mostrou nenhuma alteração no teor de fosfato.

A relação de material inorgânico sobre orgânico no tecido ósseo é biologicamente relevante porque responde pelos principais constituintes do osso, mas sofre pelo fato de ser uma razão, ou seja, uma proporção inalterada pode ser resultado do fato de que não existe qualquer alteração em qualquer um dos componentes ou os dois aumentaram proporcionalmente (Paschalis et al., 2011). Neste estudo não foi observada alteração na quantidade de colágeno entre os grupos avaliados. Isto mostra que a quantidade de componentes orgânicos e inorgânicos não foi significativamente alterada com a ovariectomia e nem com o tratamento.

Com relação a análise de maturação do colágeno foi feito o cálculo das áreas das sub-bandas de amida I localizadas em 1660 cm^{-1} e 1690 cm^{-1} . A proporção percentual da área relativa dessas sub-bandas esta relacionada com ligações cruzadas enzimáticas de colágeno maduras (PYR) e imaturas (DHLNL), que são abundantes em tecidos mineralizados (Paschalis et al., 2001). Os resultados mostraram que o tratamento com o RS causou uma diminuição da relação PYR/DHLNL em comparação aos outros grupos. Anormalidades nas ligações cruzadas enzimáticas e não enzimáticas de colágeno afetam o processo de mineralização e podem levar ao acúmulo de microdanos e prejudicar o comportamento mecânico do osso, contribuindo para o risco de fraturas (Wegrzyn et al., 2013). Gourion-Arsiquaud et al. (2009) analisaram biópsia de crista ilíaca de mulheres com e sem fraturas com FTIR e observaram que em pacientes com fraturas o valor de PYR/DHLNL era significativamente mais elevado. Farlay et al. (2011) utilizaram ratos com uma diminuição caracterizada de ligações cruzadas enzimáticas em função da inibição da lisil-oxidase, a fim de determinar a evolução da razão 1660/1690 por FTIR no tecido ósseo e comparar com as ligações cruzadas de colágeno quantificadas por cromatografia líquida e concluíram que esta razão não esta relacionada com as ligações cruzadas de colágeno, mas aumenta com a

idade mineral do osso sugerindo uma modificação na estrutura secundária do colágeno relacionada com a mineralização.

Para estudar alterações na estrutura secundária das proteínas foi utilizada a região do espectro que corresponde a amida III. Embora seja uma região com sinal fraco, ela apresenta uma grande vantagem para análise estrutural da proteína porque não apresenta interferência da vibração OH da água, que está mais concentrada na região de amida I (Fu et al., 1994). A matriz orgânica do tecido ósseo é composta por 90% de colágeno, principalmente tipo 1, e 10% de proteínas não-colágenas.

O ajuste de amida III é difícil, pois a banda tem pouca definição. Os parâmetros necessários para o ajuste, tais como: número e posição de bandas, foram obtidos pelas técnicas de deconvolução e segunda derivada. A análise de deconvolução foi utilizada para reduzir a largura das bandas e aumentar a resolução dos espectros. Assim, conseguimos observar bandas que antes não apareciam e com o cálculo da segunda derivada foram identificados os números de ondas das novas bandas. Foram escolhidos quatro picos para o ajuste, a banda de 1340 cm^{-1} foi avaliada para α -hélice, a banda 1277 cm^{-1} para RC e as bandas $1229\text{-}1245\text{ cm}^{-1}$ para β -sheet. As porcentagens das áreas das sub-bandas foram calculadas em relação a área total (Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8).

Os resultados de tal ajuste sugerem uma possível mudança estrutural das proteínas da matriz óssea nos animais ovariectomizados com aumento de estrutura β -sheet e diminuição de α -hélice e RC comparados aos animais do grupo SHAM (Gráfico 5.14). O grupo RS apresentou dados muito semelhantes aos do grupo OVZ, mostrando que o tratamento não impediu essa alteração estrutural das proteínas da matriz.

Há dificuldade em se discutir as implicações clínicas desses resultados devido a ausência na literatura de trabalhos que tenham utilizado FTIR para avaliar os efeitos do RS nos componentes biomoleculares do osso. Outros estudos com FTIR em animais e também em biópsias de pacientes tratados permitirão esclarecimentos desta importante questão.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o tratamento sistêmico com RS promoveu a reparação óssea e melhorou a microarquitetura do osso neoformado no interior do defeito. No entanto, os resultados das análises com FTIR sugerem que o RS não reverteu as alterações na matriz orgânica ocasionadas pela ovariectomia e diminuiu as ligações cruzadas de colágeno maduras.

REFERÊNCIAS ¹

Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res.* 2004 Dec;19(12):2012-20.

Ammann P. Strontium ranelate: a physiological approach for an improved bone quality. *Bone.* 2006 Feb;38(2 Suppl 1):15-8.

Arana-Chavez VE, Nanci A. High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. *J Histochem Cytochem.* 2001 Sep;49(9):1099-109.

Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, Findlay DM. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int.* 2009 Apr;20(4):653-64.

Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int.* 2009 Aug;20(8):1417-28.

Barbosa LCA. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1a ed. Viçosa: UFV; 2011. 189p.

Boivin G, Meunier PJ. The mineralization of bone tissue: A forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int.* 2003;14(Suppl 3):19–24.

Boivin G, Farlay D, Khebbab MT, Jaurand X, Delmas PD, Meunier PJ. In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization. *Osteoporos Int.* 2010;21:667–77.

Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone.* 2008 Jan;42(1):129-38.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

- Boskey A, Mendelsohn R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J Biomed Opt.* 2005 May-Jun;10(3):031102.
- Boskey AL, Goldberg M, Kulkarni A, Gomez S. Review: Infrared imaging microscopy of bone: Illustrations from a mouse model of Fabry disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1758:942-47.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86.
- Boyd SK, Szabo E, Ammann P. Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. *Bone.* 2011 May 1;48(5):1109-16.
- Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol.* 2009 Aug;157(7):1291-300.
- Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Aug;469(8):2179-93.
- Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica.* 6a ed. São Paulo: Saraiva; 2006.
- Camacho NP, Carroll P, Raggio CL. Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS) of mineralization in bisphosphonate-treated oim/oim mice. *Calcif Tissue Int.* 2003 May;72(5):604-9.
- Cebesoy O, Tutar E, Kose KC, Baltaci Y, Bagci C. Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. *Joint Bone Spine.* 2007 Dec;74(6):590-3.
- Cesareo R, Napolitano C, Iozzino M. Strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis treatment: a critical appraisal. *Int J Womens Health.* 2010 Aug 9;2:1-6.
- Cesar R, Boffa RS, Fachine LT, Leivas TP, Silva AMH, Pereira CAM, Reiff RBM, Rollo JMDA. Evaluation of trabecular microarchitecture of normal osteoporotic and osteopenic human vertebrae. *Procedia Engineering.* 2013; 59:6–15.

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):419-47.

Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone.* 2001 Apr;28(4):446-53.

Farlay D, Boivin G, Panczer G, Lalande A, Meunier PJ. Long-Term Strontium Ranelate Administration in Monkeys Preserves Characteristics of Bone Mineral Crystals and Degree of Mineralization of Bone. *J Bone Miner Res.* 2005;20(9):1569-78.

Farlay D, Duclos M-E, Gineyts E, Bertholon C, Viguet-Carrin S, Nallala J. The Ratio 1660/1690 cm⁻¹ Measured by Infrared Microspectroscopy Is Not Specific of Enzymatic Collagen Cross-Links in Bone Tissue. *PLoS ONE.* 2011;6(12): e28736.

Fu F.-N, DeOliveira, DB, Trumble WR, Sarkar HK, Singh BR. Secondary structure estimation of proteins using the amide III region of fourier transform infrared spectroscopy: application to analyze calcium-binding-induced structural changes in calsequestrin. *Appl Spectrosc.* 1994;48(11):1432-41

Fuchs RK, Allen MR, Condon KW, Reinwald S, Miller LM, McClenathan D, et al. Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 2008 Sep;19(9):1331-41.

Gali JC. Osteoporose. *Acta Ortop Bras.* 2001 Abr;9(2):3-12.

Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech.* 1994 Apr;27(4):375-89.

Gourion-Arsiquaud S, Faibish D, Myers E, Spevak L, Compston J, Hodsman A, Shane E, Recker RR, Boskey ER, Boskey AL. Use of FTIR spectroscopic imaging to identify parameters associated with fragility fracture. *J Bone Miner Res.* 2009 Sep;24(9):1565-71.

Hildebrand T1, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rüegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul;14(7):1167-74.

Hollander M, Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons.1973. p.115-20.

Huang RY, Miller LM, Carlson CS, Chance MR. In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy. *Bone*.2003;33:514-21.

Kimura-Suda H, Kajiwarra M, Sakamoto N, Kobayashi S, Ijiro K, Yurimoto H, et al. Studies on bone metabolism by using isotope microscopy, FTIR imaging, and micro-Raman spectroscopy. *J Oral Biosciences*. 2013;55:61-5.

Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH, Hu J. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2010 Nov;21(11):1889-97.

Li Y, Li X, Song G, Chen K, Yin G, Hu J. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Sep;23(9):1038-44.

Lima I, Lopes RT, Oliveira LF, Alves JM. Análise de estrutura óssea através de microtomografia computadorizada 3D. *Rev Bras Fís Med*. 2009;9(1):6-10.

Maïmoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*. 2010 May;46(5):1436-41.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci*. 2000 Feb;108(1):74-7.

Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int*. 2005 Jan;16 Suppl 1:S7-10.

Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2011 Jun;22(6):1659-67

Martín-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. *Radiology*. 2003 Dec;229(3):921-8.

Martínez-Morillo M, Grados D, Holgado S. Premenopausal osteoporosis: how to treat? *Reumatol Clin*. 2012 Mar-Apr;8(2):93-7

Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, Boskey AL. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the $\nu(4) \text{PO}_4(3^-)$ vibration. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Jul 2;1527(1-2):11-9.

Modrowski D, Miravet L, Feuga M, Marie PJ. Increased proliferation of osteoblast precursor cells in estrogen-deficient rats. *Am J Physiol*. 1993 Feb;264(2 Pt 1):E190-6.

Morohashi T, Sano T, Yamada S. Effects of strontium on calcium metabolism in rats. I. A distinction between the pharmacological and toxic doses. *Jpn J Pharmacol*. 1994 Mar;64(3):155-62.

Morohashi T, Sano T, Harai K, Yamada S. Effects of strontium on calcium metabolism in rats. II. Strontium prevents the increased rate of bone turnover in ovariectomized rats. *Jpn J Pharmacol*. 1995 Jun;68(2):153-9.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4^a ed. U.S.A.: Times Mirror Higher Education Group. 1996. 1408 p.

Ozturan KE, Demir B, Yucel I, Cakıcı H, Yilmaz F, Haberal A. Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. *J Orthop Res*. 2011 Jan;29(1):138-42.

Paschalis EP, Betts F, DiCarlo E, Mendelsohn R, Boskey AL. FTIR microspectroscopic analysis of human iliac crest biopsies from untreated osteoporotic bone. *Calcif Tissue Int*. 1997 Dec;61(6):487-92.

Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res*. 2001 Oct;16(10):1821-8.

Paschalis EP, Mendelsohn R, Boskey AL. Infrared assessment of bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Aug;469(8):2170-8.

Pleshko N, Boskey A, Mendelsohn R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys J.* 1991 Oct;60(4):786-93.

Pors Nielsen S. The biological role of strontium. *Bone.* 2004 Sep;35(3):583-8.

Przedlacki J. Strontium ranelate in post-menopausal osteoporosis. *Endokrynol Pol.* 2011 Jan-Feb;62(1):65-72.

Querido W, Farina M. Strontium ranelate increases the formation of bone-like mineralized nodules in osteoblast cell cultures and leads to Sr incorporation into the intact nodules. *Cell Tissue Res.* 2013 Nov;354(2):573-80

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2816-22. Epub 2005 Feb 22.

Reginster JY, Kaufman JM, Goemaere S, Devogelaer JP, Benhamou CL, Felsenberg D, et al. Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2012 Mar;23(3):1115-22.

Rizzoli R, Laroche M, Krieg MA, Frieling I, Thomas T, Delmas P, et al. Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2010 Aug;30(10):1341-8.

Rochkind S, Kogan G, Luger EG, Salame K, Karp E, Graif M, Weiss J. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2004 Jun;22(3):249-53.

Sales ES. Estudo da qualidade ossea através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios-X [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010.

Silva AMH. Análise morfométrica 2D e 3D de amostras de osso trabecular utilizando microtomografia tridimensional por raio-x [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo; 2009.

Silverstein, RM; Webster, FX; Kiemle, DJ. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro:LTC, 2005. 490p.

Souza MPG. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. Rev Bras Ortop. 2010;45(3):220-9.

Sun P, Cai DH, Li QN, Chen H, Deng WM, He L, et al. Effects of alendronate and strontium ranelate on cancellous and cortical bone mass in glucocorticoid-treated adult rats. Calcif Tissue Int. 2010 Jun;86(6):495-501.

Veloso MN. Avaliação in vitro dos efeitos da radiação ionizante em tecido ósseo bovino por espectroscopia ATR-FTIR e análise dinâmico-mecânica [dissertação]. São Paulo:Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares; 2013.

Vidal Bde C, Mello ML. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. Micron. 2011 Apr;42(3):283-9. doi: 10.1016/j.micron.2010.09.010. Epub 2010 Nov 18.

Wei L, Ke J, Prasadam I, Miron RJ, Lin S, Xiao Y, Chang J, Wu C, Zhang Y. A comparative study of Sr-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds for regeneration of osteopenic bone defects. Osteoporos Int. 2014 Aug;25(8):2089-96.

Wegrzyn J, Roux JP, Farlay D, Follet H, Chapurlat R. The role of bone intrinsic properties measured by infrared spectroscopy in whole lumbar vertebra mechanics: organic rather than inorganic bone matrix? Bone. 2013 Oct;56(2):229-33. doi: 10.1016/j.bone.2013.06.006. Epub 2013 Jun 15.

Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. 3a ed. Springer; 2009. 221p.

Yalin S, Sagır O, Comelekoglu U, Berköz M, Eroglu P. Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model. Pharmacol Rep. 2012;64(2):396-402.

Zhu LL, Zaidi S, Peng Y, Zhou H, Moonga BS, Blesius A, Dupin-Roger I, Zaidi M, Sun L. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 6;355(2):307-11

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **134** nas fls. **135** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Jefferson Xavier de Oliveira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em ratas ovariectomizadas"* do qual participam o(s) aluno(s) **Jucely Aparecida da Rosa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **01.10.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 02 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP