

MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE: COMPARAÇÃO ENTRE OVARIETOMIA E TOXINA BOTULÍNICA TIPO A

EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOPOROSIS: COMPARISON BETWEEN OVARIETOMY AND BOTULINUM TOXIN A

HALIL ATMACA¹, ADEM AYDIN², RESUL MUSAOĞLU³

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a toxina botulínica tipo A (TB-A) tem efeito similar ao da ovariectomia (OVX) sobre os ossos com relação à densitometria mineral óssea. **Métodos:** Um total de 51 ratas foi dividido aleatoriamente em três grupos de 17 animais cada. As ratas no primeiro grupo foram o controle, sem qualquer procedimento cirúrgico (Grupo 1). O Grupo 2 recebeu TB-A, enquanto o Grupo 3 foi submetido a OVX. Um total de 8 UI de TB-A foi injetado na região femoral direita de todas as ratas do Grupo 2. No início do estudo e 14 semanas depois, mediu-se a densidade mineral óssea (DMO) dos fêmures esquerdo e direito de todas as ratas em ambos os grupos. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à DMO do início do estudo. Na 14ª semana, a DMO dos fêmures direitos foi estatisticamente superior no Grupo 1 do que nos outros grupos, embora não houvesse diferença com significância estatística entre os Grupos 2 e 3. Os resultados médios da DMO dos fêmures esquerdos no Grupo 3 foram inferiores, com significância estatística, do que os resultados dos Grupos 1 e 2 na 14ª semana. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo mostraram que a TB-A teve efeito similar ao da OVX sobre a osteoporose, no que diz respeito à DMO. **Nível de Evidência I, Estudo Experimental, Controlado em Animais.**

Descritores: Toxinas botulínicas tipo A. Ovariectomia. Osteoporose.

ABSTRACT

Objective: To evaluate whether Botulinum toxin-A (BTX-A) has a similar effect to that of ovariectomy (OVX) on bone regarding bone mineral densitometry. **Methods:** A total of 51 female rats were randomly divided into three groups of 17 animals each. The rats in the first group formed the control group, without any surgical procedure (Group 1). Group 2 received BTX-A while Group 3 was subjected to OVX. A total of 8 IU of BTX-A was injected into the right femoral region of all rats in Group 2. At baseline and 14 weeks later, bone mineral densities (BMD) of the left and right femurs of all rats in both groups were measured. **Results:** There was no statistically significant difference between the groups with respect to baseline BMD. At the 14th week the BMD of the right femurs were statistically significantly higher in Group 1 than other groups, although there was no statistically significant difference between Groups 2 and 3. The mean BMD results of the left femur in Group 3 were statistically significantly lower than the results in Groups 1 and 2 at the 14th week. **Conclusion:** The results of the current study showed that BTX-A had a similar effect to that of OVX on osteoporosis regarding BMD. **Evidence Level I, Experimental, Controlled, Animal Study.**

Keywords: Botulinum toxins, type A. Ovariectomy. Osteoporosis.

Citação: Atmaca H, Aydin A, Musaoğlu R. Modelo experimental de osteoporose: comparação entre ovariectomia e toxina botulínica tipo A. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(6):340-3. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Atmaca H, Aydin A, Musaoğlu R. Experimental model of osteoporosis: comparison between ovariectomy and botulinum toxin A. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(6):340-3. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas e se caracteriza pela diminuição da massa óssea e pela deterioração da microarquitetura do osso, ocasionando aumento da fragilidade do esqueleto e, portanto, maior risco de fraturas. A diminuição da atividade física e a ausência de carga sobre o esqueleto podem contribuir para a perda osteoporótica. A imobilização prolongada consequente de longos períodos de repouso, a diminuição da função muscular causada por afecções e lesões neurológicas, bem como a falta do efeito da gravidade, semelhante à dos voos espaciais, resultam em perda óssea muito rápida e

grave, com a presença de desacoplamento entre a formação e a reabsorção óssea. A remoção da carga física reduz a função dos osteoblastos, enquanto, em geral, tem sido demonstrado que a estimulação mecânica tem efeito anabólico sobre a dinâmica das células, massa e qualidade ósseas.¹

Os modelos animais fornecem material experimental mais uniforme e permitem testes extensos com as possíveis terapias. O alto custo e o grande período de testes clínicos são outros motivos pelos quais os modelos animais têm papel essencial na pesquisa da osteoporose.² Ovariectomia, mudança de dieta, medicamentos, imobilização, procriação e controle central da massa óssea são

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Midyat State Hospital, Mardin, Turquia.
2. Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Izmit Seka State Hospital, Kocaeli, Turquia.
3. Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Faculdade de Medicina, Kocaeli University, Kocaeli, Turquia.

Trabalho realizado na Unidade de Pesquisa Clínica e Medicina Experimental (EMCRU) da Kocaeli University, Kocaeli, Turquia.
Correspondência: Midyat State Hospital. Department of Orthopaedics and Traumatology. 47500.Mardin-Turkey. drhalliatmaca@hotmail.com

Artigo recebido em 06/01/2013, aprovado em 31/07/2013.

comumente utilizados nos modelos animais de osteoporose.³ O modelo de ratas ovariectomizadas (OVX) é mais usado na pesquisa da osteoporose pós-menopausa. Depois da ovariectomia, a reabsorção excede a formação óssea no início, causando perda de osso. Depois desse primeiro momento, a remodelação óssea atinge um estado de equilíbrio, no qual a reabsorção e a formação ficam equilibradas.⁴

A toxina botulínica tipo A (TB-A) é um dos sete agentes de bloqueio neuromuscular sorologicamente distintos da bactéria *Clostridium botulinum*.⁵ A TB-A é altamente específica para os terminais nervosos motores e tem alta capacidade de difusão pelo músculo quando é injetada. Esses fatores tornam a TB-A um agente ideal para indução de fraqueza e paralisia muscular. Formulamos a hipótese de que a imobilização de um membro depois da injeção de TB-A pode ocasionar osteoporose regional no lado injetado. A principal finalidade deste estudo foi avaliar se a TB-A tem efeito semelhante ao da OVX sobre os ossos, com relação à densitometria mineral óssea (DMO).

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo animal e desenho do estudo

Este estudo experimental foi realizado na Unidade de Pesquisa Clínica e Medicina Experimental (EMCRU, *Experimental Medicine and Clinical Research Unit*) da Kocaeli University, depois da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais. No presente estudo, foram usadas como animais experimentais, 51 ratas Wistar albinas com idades entre 3 e 3,5 meses, pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais foram divididos randomicamente em três grupos com 17 ratas cada um. As ratas no primeiro grupo foram controladas, sem qualquer procedimento cirúrgico (Grupo 1). O Grupo 2 recebeu TB-A, enquanto o grupo 3 foi submetido a OVX. Um total de 8 UI de TB-A (Botox®, Allergan, Irvine, Califórnia) foi injetado na região femoral direita de todas as ratas do Grupo 2; 4 UI no conjunto de músculos anteriores e 4 UI no conjunto de músculos posteriores.⁶ No início do estudo e 14 semanas depois, mediu-se, *in vivo*, a densidade mineral óssea (DMO) dos fêmures esquerdo e direito de todas as ratas nos três grupos, com anestesia com cetamina e absorciometria por dupla emissão de raios X. Depois das medidas iniciais da DMO, realizou-se a ovariectomia bilateral nas ratas do Grupo 3. As ratas foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal de cetamina (50 mg/kg – Ketalar®). As ratas receberam injeção intramuscular de 500 mg/kg de ampicilina-sulbactam (Ampisid®). Foram submetidas a tricotomia, preparadas assepticamente e foram operadas pelo mesmo cirurgião. A OVX foi realizada por incisão transversal ventral. Todas as ratas foram aclimatadas às condições laboratoriais em gaiolas e receberam dieta padrão e água *ad libitum*. A temperatura e a umidade da sala foram mantidas em 20 a 24°C e 50%-60%, respectivamente. O ciclo de luz foi fixado em 12 horas. Dois animais do Grupo 1, um do Grupo 2 e dois do Grupo 3 morreram durante o período de acompanhamento (um durante a cirurgia), de modo que, ao final, foram avaliadas 46 ratas e 92 fêmures. Todos os animais do estudo foram sacrificados na 14ª semana com uma alta dose de cetamina.

Densitometria óssea

No início e 14 semanas mais tarde, a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur foi medida *in vivo*, sob anestesia, com absorciômetro de dupla emissão de raios X (Norland XR-36), utilizando em cada rata, o software para pequenos animais. Inicialmente, 51 ratas e 102 fêmures foram avaliados, mas ao final de 14 semanas, foram avaliadas 46 ratas e 92 fêmures. Em todas as medidas, os animais foram colocados em posição supina, com abdução total dos membros posteriores e cada análise foi realizada pelo mesmo

investigador. O instrumento foi calibrado diariamente. As imagens digitais foram analisadas e a DMO (em gramas por centímetro quadrado) (g/cm²) da região da metáfise proximal do fêmur foi determinada.

Análise estatística

Cada animal foi avaliado separadamente em 12 subgrupos com relação à DMO do fêmur direito e esquerdo, em termos de média basal e final (14ª semana). A média e o desvio padrão (DP) foram calculados para as estatísticas descritivas das variáveis contínuas e os valores medianos para as variáveis discretas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. As médias dos grupos foram analisadas usando ANOVA. O procedimento de comparação múltipla *post hoc* de Bonferroni foi utilizado para determinar os valores que foram significativamente diferentes. O teste *t* pareado foi utilizado para comparar as médias dos dados de DMO entre os subgrupos. A hipótese bicaudal foi considerada nas análises e uma diferença significativa foi aceita enquanto $p \leq 0,05$. O software SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas.

RESULTADOS

A DMO média no acompanhamento inicial e final dos fêmures direito e esquerdo de todos os animais é apresentada na Figura 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à DMO basal no fêmur direito e esquerdo ($p=1,000$ e $p=0,788$, respectivamente). Com relação à DMO dos fêmures direitos na 14ª semana, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,000$). O teste de Bonferroni mostrou que a diferença originava-se no Grupo 1, quando comparado com os outros, enquanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 2 e 3 ($p=0,256$). Os resultados médios da DMO dos fêmures esquerdos no Grupo 3 foram estatisticamente inferiores aos resultados dos Grupo 1 e Grupo 2 na 14ª semana. Os resultados estatisticamente significantes de todos os subgrupos são apresentados na Tabela 1.

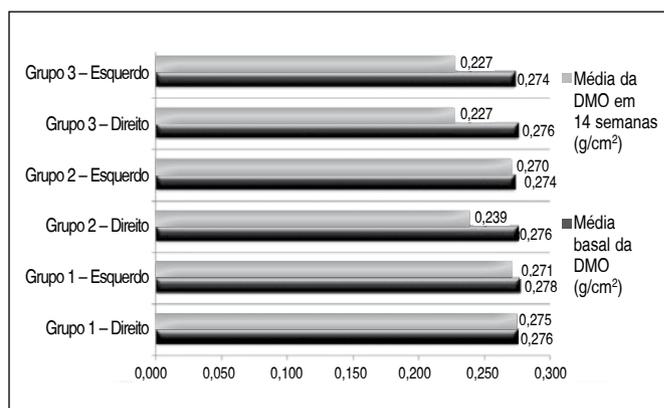


Figura 1. Média basal e em 14 semanas da densitometria mineral óssea em ratas dos grupos controle, injeção de toxina botulínica tipo A e ovariectomia

DISCUSSÃO

A redução da DMO depois de ovariectomia é esperada em ambos os fêmures.⁴ Além disso, a injeção de TB-A diminuiu a DMO dos fêmures direitos nas ratas da mesma forma que a OVX, enquanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os fêmures esquerdos dos mesmos animais do Grupo 2 e os do grupo controle.

Tabela 1. Diferenças estatísticas entre os subgrupos obtidos nos testes *t* pareados.

	Média basal da DMO Grupo 1D (N = 17)	Média basal da DMO Grupo 1E (N = 17)	Média basal da DMO Grupo 2D (N = 17)	Média basal da DMO Grupo 2E (N = 17)	Média basal da DMO Grupo 3D (N = 17)	Média basal da DMO Grupo 3E (N = 17)	Média da DMO em 14 semanas Grupo 1D (N = 15)	Média da DMO em 14 semanas Grupo 1E (N = 15)	Média da DMO em 14 semanas Grupo 2D (N = 16)	Média da DMO em 14 semanas Grupo 2E (N = 16)	Média da DMO em 14 semanas Grupo 3D (N = 15)	Média da DMO em 14 semanas Grupo 3E (N = 15)
Média basal da DMO Grupo 1D (N = 17)	1,000											
Média basal da DMO Grupo 1E (N = 17)	0,710	1,000										
Média basal da DMO Grupo 2D (N = 17)	1,000	0,750	1,000									
Média basal da DMO Grupo 2E (N = 17)	0,858	0,608	0,841	1,000								
Média basal da DMO Grupo 3D (N = 17)	1,000	0,829	1,000	0,841	1,000							
Média basal da DMO Grupo 3E (N = 17)	0,766	0,577	0,777	0,939	0,715	1,000						
Média da DMO em 14 semanas Grupo 1D (N = 15)	0,840	0,678	0,885	0,937	0,955	0,739	1,000					
Média da DMO em 14 semanas – Grupo 1E (N = 15)	0,728	0,301	0,657	0,700	0,594	0,743	0,474	1,000				
Média da DMO em 14 semanas – Grupo 2D (N = 16)	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	0,003*	0,000*	0,000*	0,000*	1,000			
Média da DMO em 14 semanas – Grupo 2E (N = 16)	0,485	0,412	0,429	0,069	0,476	0,606	0,364	0,865	0,001*	1,000		
Média da DMO em 14 semanas – Grupo 3D (N = 15)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,256	0,000*	1,000	
Média da DMO em 14 semanas – Grupo 3E (N = 15)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	0,000*	0,350	0,000*	0,727	1,000

*indica diferença significante quando $p \leq 0,05$. As áreas em cinza escuro mostram as diferenças sem significância estatística entre o grupo injetado com TB-A e o grupo OVX. N indica o número de fêmures avaliados. D = direito, E = esquerdo, DMO = densidade mineral óssea.

Várias intervenções experimentais são utilizadas para induzir osteopenia e osteoporose em ratos.⁴ A taxa de perda de massa óssea em ratos machos e fêmeas é altamente dependente do método utilizado para induzir a osteoporose, do local avaliado e se essa perda é de osso trabecular ou cortical.^{4,7} Todos os protocolos experimentais de osteoporose podem ser implementados em ratos esqueleticamente maduros ou imaturos.⁸ Embora os ratos atinjam a maturidade sexual com 2,5 meses de idade, seu esqueleto é considerado maduro após 10 meses de idade.⁷ Quando são utilizados ratos esqueleticamente imaturos, um pico de baixa massa óssea é atingido, o que é considerado um fator de risco elevado para fraturas humanas devido à osteoporose. É por causa dessa característica que o rato com imaturidade esquelética é um modelo animal apropriado na pesquisa de fatores endócrinos, nutricionais e ambientais que podem influenciar o pico de massa óssea.

O rato esqueleticamente maduro é um modelo animal apropriado para a pesquisa de osteoporose pós-menopausa e por imobilização.⁹ Depois da OVX, a reabsorção óssea excede, inicialmente, a formação óssea, levando à perda de osso. Logo após, a remodelação óssea atinge um estado de equilíbrio, no qual a reabsorção e a formação ficam equilibradas.⁴ No osso cortical, a dilatação da cavidade medular é uma medida indireta da perda óssea. Essa dilatação na diáfise de ossos longos deve-se ao aumento da reabsorção de osso endosteal¹⁰ e à aposição de osso periosteal.¹¹

A reabsorção endosteal e a formação endosteal simultânea resultam em baixa velocidade de perda de osso cortical.¹¹ As principais preocupações com a OVX são seus efeitos irreversíveis e generalizados sobre os ossos e outros efeitos sistêmicos. A TB-A, porém, é fácil de aplicar e tem efeito osteoporótico regional e reversível. Outro método para induzir a osteoporose em ratos é a imobilização. Há vários métodos de imobilização.⁴⁻¹³ Por causa do fenômeno acelerador regional, a velocidade de perda óssea é mais rápida depois de métodos cirúrgicos do que depois da imobilização.¹⁴ No modelo de imobilização, a maior parte da perda óssea ocorre nos membros posteriores, porque são o local de maior carga mecânica, mas, em geral, a velocidade de perda óssea é maior no osso trabecular do que no cortical. Essa diferença pode ser parcialmente atribuída à proporção superfície/volume, que é maior no osso trabecular.⁷ No presente estudo, a TB-A foi usada como método de imobilização e teve resultado similar ao da OVX sobre a DMO. No entanto, a ausência de mobilização rápida devido à paralisia do fêmur direito das ratas no Grupo 2 ocasionou redução leve e estatisticamente insignificante no fêmur esquerdo, com relação à DMO.

Recentemente, Aydın *et al.*¹⁵ apresentaram seus resultados referentes ao efeito da TB-A sobre a consolidação de fraturas. Relataram aumento estatisticamente significativo de união, formação de osso trabecular e escores de organização de medula óssea, assim como

do valor do módulo de elasticidade dos lados que receberam TB-A. Os autores concluíram que a administração da TB-A aumenta a potência de consolidação em fraturas relativamente fixadas e diminui o diâmetro do calo ósseo, como se tivesse sido realizada uma fixação rígida.¹⁵ Contudo, Hao *et al.*¹⁶ visavam investigar se a atrofia e a disfunção muscular local afetam a consolidação em modelo de fratura em fêmur de rato utilizando a toxina botulínica tipo A (TB-A). Eles concluíram que os testes biomecânicos indicaram que os fêmures do lado tratado com TB-A exibiram propriedades mecânicas inferiores em comparação com o lado de controle. O resultado inferior depois da injeção de TB-A, em comparação com a injeção de soro fisiológico, em termos de resistência do calo ósseo pode ser consequência de carga inesperada e instabilidade mecânica provocada pela atrofia e disfunção muscular. Com base nessa informação, pode-se indicar que o uso de TB-A em vez de OVX não é recomendado nos estudos que avaliam a consolidação de fraturas e a osteoporose simultaneamente.

A combinação de OVX e imobilização reúne as vantagens dos dois métodos e pode reduzir acentuadamente o tempo até que a perda de massa óssea se torne aparente, em especial para o osso cortical.^{17,18} O presente estudo teve como principal falha a falta de dados sobre o efeito da OVX e da imobilização nos mesmos indivíduos. Embora as características biomecânicas, a espessura do osso cortical e trabecular e também o peso dos músculos não tenham sido avaliados para investigar atrofia, o presente estudo mostrou que a TB-A teve efeito semelhante ao da OVX sobre a DMO, o que pode ser útil em outras investigações com modelos experimentais de osteoporose em animais.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a TB-A tem efeito osteoporótico semelhante ao da OVX sobre os ossos, com relação à densidade mineral óssea em ratos, que têm sido usados com frequência em modelos de osteoporose em animais.

REFERÊNCIAS

1. Bikle DD, Halloran BP, Morey-Holton E. Space flight and the skeleton: lessons for the earthbound. *Endocrinologist*. 1997;7(1):10-22.
2. Hartke JR. Preclinical development of agents for the treatment of osteoporosis. *Toxicol Pathol*. 1999;27(1):143-7.
3. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005;16(Suppl 2):S129-38.
4. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-30.
5. Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve Suppl*. 1997;6:S146-68.
6. Aoki KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicol*. 2001;39(12):1815-20.
7. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1(3):193-207.
8. Shen V, Liang XG, Birchman R, Wu DD, Healy D, Lindsay R, et al. Short-term immobilization-induced cancellous bone loss is limited to regions undergoing high turnover and/or modeling in mature rats. *Bone*. 1997;21(1):71-8.
9. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(1):117-27.
10. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res*. 1987;2(2):115-22.
11. Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM. Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*. 1991;12(6):439-46.
12. Zeng QQ, Jee WS, Bigornia AE, King JG Jr, D' Souza SM, Li XJ, et al. Time responses of cancellous and cortical bones to sciatic neurectomy in growing female rats. *Bone*. 1996;19(1):13-21.
13. Thompson DD, Rodan GA. Indomethacin inhibition of tenotomy-induced bone resorption in rats. *J Bone Miner Res*. 1988;3(4):409-14.
14. Frost HM. The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hosp Med J*. 1983;31(1):3-9.
15. Aydin A, Memisoglu K, Cengiz A, Atmaca H, Muezzinoglu B, Muezzinoglu US. Effects of botulinum toxin A on fracture healing in rats: an experimental study. *J Orthop Sci*. 2012;17(6):796-801.
16. Hao Y, Ma Y, Wang X, Jin F, Ge S. Short-term muscle atrophy caused by botulinum toxin-A local injection impairs fracture healing in the rat femur. *J Orthop Res*. 2012;30(4):574-80.
17. Cavolina JM, Evans GL, Harris SA, Zhang M, Westerlind KC, Turner RT. The effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signaling peptides in ovariectomized growing rats. *Endocrinology*. 1997;138(4):1567-76.
18. Okumura H, Yamamuro T, Kasai R, Hayashi T, Tada K, Nishii Y. Effect of 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on osteoporosis induced by immobilization combined with ovariectomy in rats. *Bone*. 1987;8(6):351-5.