



Artigo Original

Histomorfometria da matriz orgânica do fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio[☆]



Patricia Tanios Haddad, Márcio Salazar e Luzmarina Hernandez*

Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 18 de outubro de 2013

Aceito em 5 de janeiro de 2014

On-line em 26 de julho de 2014

Palavras-chave:

Ovariectomia

Alendronato

Osteoporose

Matriz óssea

R E S U M O

Objetivo: avaliar a efeito de duas concentrações diferentes de alendronato de sódio (ALN) sobre a quantidade de matriz orgânica no fêmur de ratas com supressão estrogênica provocada por ovariectomia.

Métodos: ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias foram submetidas a laparotomia bilateral para remoção dos ovários. Os animais foram divididos em grupo controle, no qual os animais foram apenas laparotomizados; grupo ovariectomizado (OVX); grupo ovariectomizado tratado com 1 mg/kg de ALN (OVX 1 mg); e grupo ovariectomizado tratado com 2 mg/kg de ALN (OVX 2 mg). Receberam ALN duas vezes por semana durante 90 dias. O fêmur esquerdo foi coletado, fixado e processado para inclusão em parafina. Cortes semisseriados corados com H&E foram usados para a obtenção, com um software de análise de imagens, da área ocupada por matriz óssea orgânica. O peso dos animais foi obtido no início e no fim do experimento.

Resultados: os animais ovariectomizados e aqueles tratados com 1 mg/kg de ALN tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) no peso corporal quando comparados com o grupo controle. A análise histomorfométrica revelou que nos animais tratados com 2 mg/kg de ALN a área (μm^2) ocupada por matriz orgânica (181.900 ± 18.130) foi semelhante ($p > 0,05$) àquela dos animais controle não ovariectomizados (204.800 ± 9.590), o que indica um efeito preventivo desse medicamento sobre a perda de massa óssea.

Conclusão: a maior concentração do medicamento administrado duas vezes por semana por 90 dias foi mais eficaz do que a dose de 1 mg/kg no mesmo período.

© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

[☆] Trabalho desenvolvido no Laboratório de Histotécnica Animal da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mails: lhernandes@uem.br, luzhernandes@gmail.com (L. Hernandez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.01.021>

0102-3616/© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Histomorphometry of the organic matrix of the femur in ovariectomized rats treated with sodium alendronate

A B S T R A C T

Keywords:

Ovariectomy
Alendronate
Osteoporosis
Bone matrix

Objective: to evaluate the effect of two different concentrations of sodium alendronate on the quantity of organic matrix in the femur of rats with estrogen suppression caused by ovariectomy.

Methods: sixty-day-old Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were subjected to bilateral laparotomy to remove the ovaries. The animals were divided into a control group, in which they only underwent laparotomy; an ovariectomized group (OVX); an ovariectomized group treated with 1 mg/kg of alendronate (OVX 1 mg); and an ovariectomized group treated with 2 mg/kg of alendronate (OVX 2 mg). The rats received alendronate twice a week for 90 days. The left femur was then removed, fixed and processed for embedding in paraffin. Semi-serial sections stained with hematoxylin and eosin were used to determine the area occupied by organic bone matrix, by means of image analysis software. The animals' weights were obtained at the beginning and end of the experiment.

Results: the ovariectomized animals and those treated with 1 mg/kg of alendronate presented significant increases in body weight ($p < 0.05$), in comparison with the control group. Histomorphometric analysis revealed that in the animals treated with 2 mg/kg of alendronate, the area (μm^2) occupied by organic matrix ($181,900 \pm 18,130$) was similar ($p > 0.05$) to that of the non-ovariectomized control animals ($204,800 \pm 9,590$), which indicates that this medication had a preventive effect with regard to bone mass loss.

Conclusion: the higher concentration of the medication, administered twice a week for 90 days, was more effective than the dose of 1 mg/kg over the same period.

© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A osteoporose pós-menopausa é uma doença caracterizada pela deterioração da microarquitetura e redução da massa óssea em função do aumento na reabsorção pelos osteoclastos, com consequente aumento na susceptibilidade a fraturas, cuja prevalência é muito alta, mais frequente do que a soma dos casos de infarto do miocárdio, câncer de mama e acidente vascular cerebral.¹ A osteoporose deve ser considerada como um problema de saúde pública,² porque afeta o indivíduo em sua função social, física e laboral e, portanto, provoca impacto socioeconômico.³ A principal causa da perda de massa óssea nas mulheres é a deficiência de estrogênio na menopausa.⁴

Os bifosfonatos tornaram-se na última década a pedra angular no tratamento da osteoporose.⁵ São usados para o tratamento e a prevenção dessa doença e de doenças oncológicas que resultam no aumento de remodelação óssea.⁶ Os bifosfonatos têm uma estrutura química que tem forte afinidade com o fosfato de cálcio, o que facilita sua ligação ao osso. Durante a reabsorção óssea,⁷ o fármaco é absorvido pelos osteoclastos e provoca o rompimento do citoesqueleto, perda da borda pregueada, inibição das enzimas lisossomais, perda da atividade reabsortiva e morte por apoptose.⁸ Dessa forma, há uma diminuição da atividade osteoclástica, sem interferência direta na atividade neoformadora.⁹

O ALN é um aminobifosfonato de segunda geração, potente inibidor da reabsorção osteoclástica.¹⁰ O uso do ALN suprime a remodelação óssea^{11,12} e aumenta a densidade mineral óssea

(DMO), o que contribui para evitar as fraturas vertebrais e não vertebrais. Com o uso do ALN, os marcadores de *turn over* ósseo apresentam-se reduzidos.¹² O uso de uma dose específica de ALN para o tratamento da osteoporose resulta em desaceleração importante na progressão da doença.⁸

O modelo animal mais usado para o estudo da osteoporose pós-menopausa é a ovariectomia, porque em um período relativamente curto pós-ovariectomia já se obtém um estado de osteopenia muito semelhante à humana.^{13,14} Com o uso de animais também é possível investigar as diferentes formas de tratamento e de medicamentos existentes no mercado. Entretanto, não há um consenso a respeito da dose adequada para testes em animais. O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas frente a duas concentrações distintas de ALN, um dos fármacos disponíveis no mercado mais usados para o tratamento da osteoporose.

Material e métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (protocolo n° 033/2009).

Procedimento experimental

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias foram anestesiadas com uma injeção intramuscular de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Ronpun®) e cloridrato de

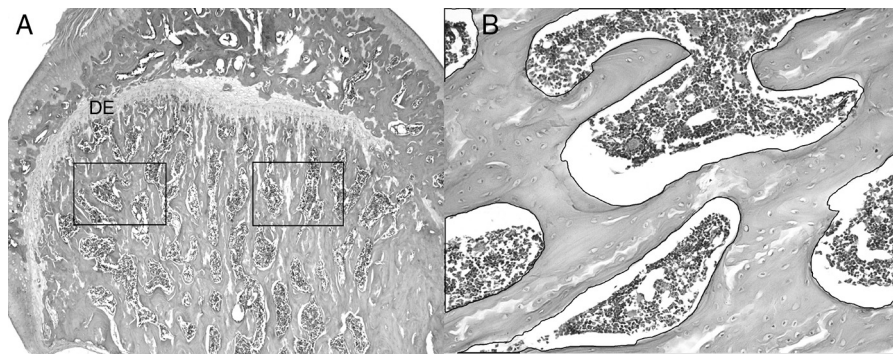


Figura 1 – Fotomicrografia do fêmur esquerdo de rata Wistar. (A) As áreas marcadas indicam os campos microscópicos que foram capturados pelo software Image Pro Plus, para a análise morfométrica da área ocupada por colágeno. Aumento original 4x. (B) Representa a forma como foi obtida a medida da área ocupada por colágeno: a área total foi determinada e as áreas dos espaços vazios foram somadas e posteriormente subtraídas da área total. Aumento original 20x. Hematoxilina e eosina.

quetamina (Ketalar®) na relação 1:1. Empregou-se dessa associação 1 mL.Kg^{-1} de peso corporal para a laparotomia e a remoção dos ovários. Aguardou-se até que desaparecessem os reflexos interdigital e ocular. A ventilação pulmonar foi mantida de maneira espontânea. Até a recuperação da anestesia os animais foram observados quanto ao reflexo ocular (pela estimulação da pálpebra superior com gaze), à frequência respiratória (observação direta dos movimentos torácico-abdominais) e à frequência cardíaca (verificada com estetoscópio pediátrico fixado na região anterior do tórax).

Os animais foram divididos em quatro grupos de oito cada: um grupo controle, no qual os animais foram apenas laparotomizados; um grupo ovariectomizado (OVX); um grupo ovariectomizado tratado com 1 mg/kg de ALN (OVX 1mg); e um grupo ovariectomizado tratado com 2 mg/kg de ALN (OVX 2mg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em número de quatro por gaiola sob a temperatura de 20°C , ciclo de claro/escuro de 12 horas e livre acesso a água e alimentação durante todo o período experimental. Todos os animais foram pesados no início e no fim do experimento.

Na semana seguinte à ovariectomia e durante os 90 dias seguintes os grupos tratados foram injetados por via intramuscular com ALN 1 mg/kg ou 2 mg/kg duas vezes por semana, sempre na mesma hora. Após o período de tratamento os animais foram sacrificados com uma sobredose de cetamina. O fêmur esquerdo de cada animal foi removido e fixado em solução de paraformaldeído 4% por 48 horas. Procedeu-se então à dissecação dos tecidos moles e posterior desmineralização do osso em ácido fórmico por 21 dias. A seguir as amostras foram lavadas em água corrente por seis horas e processadas para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semisseriados de $7\ \mu\text{m}$ ao longo do maior eixo do fêmur. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise.

Para a determinação da área ocupada pela matriz orgânica, foram capturadas duas imagens de uma área padronizada na diáfise proximal, logo abaixo do disco epifisário do fêmur esquerdo (figs. 1A-B). As imagens foram obtidas de três cortes por lâmina, em quatro lâminas por animal, totalizando 24 imagens por animal. Foi usado um sistema de captura de

imagens composto por microscópio Olympus BX41 (Tóquio, Japão) com câmara Q. Color 3 RT Olympus (Tóquio, Japão) acoplada. As imagens foram obtidas com objetiva de $20\times$.

A área ocupada por colágeno foi submetida a um software de análise de imagem (Image Pro-Plus®, versão 4.5, Media Cibernética, Silver Spring, MD), que obteve a área em micrometros quadrados.

A área avaliada era composta por osso trabecular e para o cálculo da área ocupada pela matriz orgânica a seguinte metodologia foi adotada: em primeiro lugar foi calculada a área total da imagem com a objetiva de $20\times$; a seguir as áreas vazias de cada corte, que correspondem ao trabeculado ocupado por medula óssea, foram mensuradas e somadas para ser posteriormente subtraídas da área total (fig. 2). O resultado final corresponde à área ocupada pela matriz orgânica. Todos os cálculos foram feitos no programa Excel (Microsoft Corporation). Foi obtida a área média em μm^2 de cada animal para a comparação estatística.

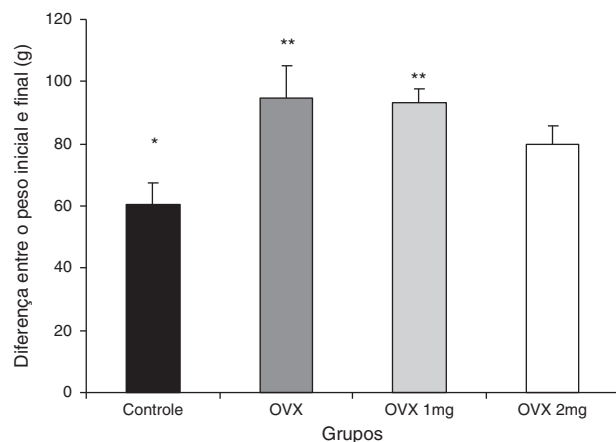


Figura 2 – Diferença entre o peso corporal inicial e final de ratos controle, ovariectomizadas (OVX) e ovariectomizadas tratadas com 1 mg/kg (OVX 1mg) ou 2 mg/kg (OVX 2mg) de alendronato de sódio. Resultados são expressos como média \pm DP. $P < 0,05$ quando comparados * com **.

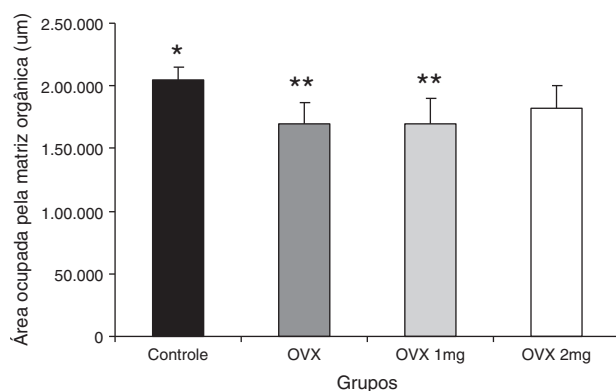


Figura 3 – Área (μm^2) ocupada por matriz óssea orgânica de ratas controle, ovariectomizadas (OVX) e ovariectomizadas tratadas com 1 mg/kg (OVX 1 mg) ou 2 mg/kg (OVX 2 mg) de alendronato de sódio. Resultados são expressos como média \pm DP. $P < 0,05$ quando comparados * com **.

Análise estatística

Foi feita com o programa GraphPad Prism R 3.1. Os dados obtidos foram representados como média \pm desvio padrão. O teste de análise de variância usado foi o Anova. O teste de Tukey foi usado como pós-teste para comparação entre as médias. O nível de significância adotado foi 5%.

Resultados

O peso (g) inicial e final dos animais está representado na [figura 2](#). A [figura 3](#) apresenta os resultados da análise da área (μm^2) ocupada pela matriz óssea orgânica.

Discussão

A ovariectomia experimental é um modelo de estudo que permite avaliar, em animais, as consequências da perda de massa óssea em diversas situações.¹⁵ O mais frequente é o estudo da eficácia de medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da osteoporose.^{4,8,10,16} Nesse modelo um período de três meses após a remoção dos ovários é suficiente para que ocorra uma significativa perda de massa óssea no fêmur de ratas ovariectomizadas.¹⁷

A ovariectomia leva a um progressivo e importante aumento no peso corporal.¹⁸ Neste estudo ratas ovariectomizadas foram tratadas por 90 dias com duas concentrações diferentes de ALN. Houve um aumento no peso corporal nas ratas ovariectomizadas não tratadas e naquelas que receberam 1 mg/kg de alendronato de sódio. Os animais que receberam 2 mg/kg não tiveram alteração no peso corporal quando comparados com o grupo controle. Esses resultados demonstram que a dose de 2 mg/kg foi mais eficiente na prevenção do ganho de massa corporal.

A deficiência de estrogênio pode estar relacionada à diminuição de receptores de leptina no hipotálamo e provoca diminuição da saciedade,¹⁹ maior ingesta alimentar e consequente ganho de massa corpórea. Por outro lado, há

também possibilidade de diminuição do gasto energético em fêmeas com deficiência de estrogênio, fato que facilitaria o ganho de massa corpórea.²⁰

As ratas ovariectomizadas receberam tratamento com 1 ou 2 mg/kg de ALN duas vezes por semana. É importante ressaltar que o início do tratamento aconteceu um dia após a ovariectomia e, portanto, as fêmeas não apresentavam um quadro de perda óssea instalado. Por meio da análise histomorfométrica da matriz orgânica constatou-se que o tratamento com 2 mg/kg de ALN teve um efeito preventivo sobre a perda de massa óssea. Os animais que receberam 1 mg/kg apresentaram diminuição da matriz óssea semelhante àquela dos animais ovariectomizados.

Os bisfosfonatos diminuem o grau de crescimento ósseo sem, porém, interferir na qualidade de resistência mecânica do osso,²¹ ou seja, há uma prevenção da reabsorção pelo ALN, mas o osso mantém suas características estruturais e mecânicas normais.²² Os bifosfonatos tornam o *turn over* ósseo mais lento e proporcionam mais tempo para a organização estrutural óssea, sem prejudicar ou alterar as propriedades mecânicas do tecido.²³

Em humanos, a posologia recomendada de ALN é de 1 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana. Entretanto, os ratos têm um metabolismo duas vezes mais rápido do que os humanos e por essa razão a administração do fármaco foi feita duas vezes por semana. A dose de 1 mg/kg foi escolhida por se assemelhar àquela aplicada aos humanos e, por outro lado, a dose de 2 mg/kg foi escolhida para ser a dose testada.

Não há consenso entre os autores a respeito da dose de ALN que deve ser administrada aos animais. Ito et al.¹⁶ constataram, em seu trabalho em ratas ovariectomizadas, que a administração diária de 0,2 mg e 1 mg/kg, por 12 semanas, provocou um aumento significativo na quantidade de matriz orgânica, em comparação com os animais ovariectomizados não tratados; a densidade mineral óssea (DMO) do grupo ovariectomizado foi 24,2% menor do que a do grupo controle. Allen²⁴ avaliou as concentrações de 0,1, 0,2 e 1 mg/kg/dia de ALN durante o tratamento de um ano. Constatou que os melhores resultados foram obtidos com maiores concentrações do medicamento.

Diversos outros autores testaram diferentes concentrações de ALN, em tempos diferentes, com associação ou não com outras substâncias, como vitamina K,²⁵ vitamina D3,¹⁶ cálcio²⁶ e estradiol.⁴ Os resultados desses estudos demonstram, de maneira geral, que o ALN apresenta um efeito anabólico sobre a perda de massa óssea em animais ovariectomizados.

Nossos resultados mostraram que a dose de 1 mg/kg duas vezes semana não foi suficiente para estimular um efeito anabólico. Entretanto, Masaya et al.¹⁶ e Allen²⁴ demonstraram nessa mesma concentração, com o tratamento diário, um aumento na densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas, após 12 semanas e um ano, respectivamente.

Conclusão

Ao menos três parâmetros devem ser levados em consideração quando se usa o ALN em modelos animais: a dose, o tempo de tratamento e a posologia. Assim, para as menores concentrações do medicamento, as doses devem ser

mais frequentes e o tratamento deve ser por um período maior, para que se alcancem resultados desejáveis, e para as concentrações maiores a frequência de administração pode ser menor.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Perez-López FR. Postmenopausal osteoporosis and alendronate. *Maturitas*. 2004;48(3):179-92.
- Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*. 1993;94:646-50.
- Anbinder AL, Prado F, Prado M de A, Balducci I, Rocha RF. The influence of ovariectomy, simvastatin, and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res*. 2007;21(3):247-52.
- Da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry, and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(8):1015-22.
- Fisher A, Martin J, Srikusalanukul W, Davis M. Bisphosphonate use and hip fracture epidemiology: ecologic proof from the contrary. *Clin Interv Aging*. 2010;5:355-62.
- Inzerillo AM, Zaidi M. Osteoporosis: trends and intervention. *Mt Sinai J Med*. 2002;69(4):220-31.
- Skripitz R, Johansson HR, Ulrich SD, Werner A, Aspenberg P. Effect of alendronate and intermittent parathyroid hormone on implant fixation in ovariectomized rats. *J Orthop Sci*. 2009;14(2):138-43.
- Christopoulou GE, Stavropoulou A, Anastassopoulos G, Panteliou SD, Papadaki E, Karamanos NK, et al. Evaluation of modal damping factor as a diagnostic tool for osteoporosis and its relation with serum osteocalcin and collagen I N-telopeptide for monitoring the efficacy of alendronate in ovariectomized rats. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41(3):891-7.
- Lindsay R, Silverman SL, Cooper C, Hanley DA, Barton I, Broy SB, et al. Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA*. 2001;285(3):320-3.
- Azuma Y, Sato H, Oue Y, Okabe K, Ohta T, Tsuchimoto M, et al. Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. *Bone*. 1995;16(2):235-45.
- Iwamoto J, Miyata A, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H. Five-year alendronate treatment outcome in older postmenopausal Japanese women with osteoporosis or osteopenia and clinical risk factors for fractures. *Ther Clin Risk Manag*. 2009;5:773-9.
- Orwoll E, Ettinger M, Weiss S, Miller P, Kendler D, Graham J, et al. Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. *N Engl J Med*. 2000;343(9):604-10.
- Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1997;20(1):55-61.
- Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1990;10(4):295-301.
- Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int*. 1997;61(4):336-44.
- Ito M, Azuma Y, Takagi H, Komoriya K, Ohta T, Kawaguchi H. Curative effect of combined treatment with alendronate and 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on bone loss by ovariectomy in aged rats. *Jpn J Pharmacol*. 2002;89(3):255-66.
- Hernandes L, Ramos AL, Micheletti KR, Santi AP, Cuoghi OA, Salazar M. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2012;23(2):467-73.
- Ignacio DL, Frankenfeld TG, Fortunato RS, Vaisman M, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP. Body mass regulation by estrogen and physical activity. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(3):310-7.
- Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(4):1349-53.
- Richard D. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol*. 1986;250 2 Pt 2:R245-9.
- Lepola VT, Kippo K, Hannuniemi R, Lauren L, Virtamo T, Osterman T, et al. Bisphosphonates clodronate and etidronate in the prevention of ovariectomy-induced osteopenia in growing rats. *J Bone Miner Res*. 1996;11(10):1508-17.
- Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Martini L, Giardino R. The ovariectomized ewe model in the evaluation of biomaterials for prosthetic devices in spinal fixation. *Int J Artif Organs*. 2001;24(11):814-20.
- Rodan GA. Alendronate: preclinical studies. *Rev Rhum Engl Ed*. 1997;64(6 Suppl):50S-2S.
- Allen MR. Morphological assessment of basic multicellular unit resorption parameters in dogs shows additional mechanisms of bisphosphonate effects on bone. *Calcif Tissue*. 2010;86(1):67-71.
- Sasaki H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Kamo K, et al. Effects of combination treatment with alendronate and vitamin K(2) on bone mineral density and strength in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(4):403-9.
- Chen BL, Xie DH, Zheng ZM, Lu W, Ning CY, Li YQ, et al. Comparison of the effects of alendronate sodium and calcitonin on bone-prosthesis osseointegration in osteoporotic rats. *Osteoporos Int*. 2011;22(1):265-70.