

FABIO PIRES DE MORAES

**ANALISES HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA NO FÊMUR DE RATAS
(*Rattus norvegicus*) COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

FÁBIO PIRES DE MORAES

**ANÁLISE HISTOLÓGICAS E MORFOMÉTRICA NO FÊMUR DE RATAS
(*Rattus norvegicus*) COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2006

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Co-orientador)

Prof^a Andréa Pacheco Batista Borges
(Co-orientadora)

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Prof. Cláudio César Fonseca

Prof^a Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Orientadora)

Dedico este trabalho
Aos meus pais: Celso e Hilda,
Aos meus irmãos: Renata e Leandro
A minha esposa Ivana.
Pelo incentivo e força que me deram nos
momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai maior que tudo nos provê.

Aos meus pais, por me proporcionarem a oportunidade de estudo e estarem sempre ao meu lado, deixando até mesmo suas próprias necessidades em função das minhas.

Aos meus irmãos, pela amizade e incentivo.

À minha amada esposa, por seu companheirismo e compreensão, sei como foi difícil.

Aos meus tios e primos, que sempre torceram por mim e me incentivaram.

À Universidade Federal de Viçosa, pela possibilidade de realização do Mestrado em Medicina Veterinária.

À minha orientadora e amiga, Professora Marlene, pela orientação na elaboração deste trabalho e mais ainda pelas orientações para a vida, e até pelos puxões de orelha. Sei que foram necessários.

Ao professor Eduardo Paulino, pelo grande auxílio na realização das análises estatísticas.

A todos os professores do DVT, principalmente àqueles que foram mais que professores foram grandes amigos. Vocês sabem quem são.

Aos funcionários do DVT, pela presteza e amizade.

Aos meus grandes amigos Ferdinan, Paulo, Celber, Daniel, Rose, Miriam e Cristina pelos momentos bons e ruins que passamos juntos. Vocês estarão para sempre do lado esquerdo do meu peito.

Aos meus irmãos do “Quatro estações moto clube” pelos excelentes momentos e pelo companheirismo.

Ao presidente do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal (IDAF), Paulo Roberto, pelo apoio e compreensão.

Aos meus irmãos posições Duda, Netão, Lucas, Eloilton, Gwuillian, Gus e Cabelo, por estarem sempre presentes e prontos para o que for preciso.

A todos que contribuíram de qualquer forma para que este trabalho fosse concluído.

BIOGRAFIA

FABIO PIRES DE MORAES, filho de Celso Pires de Oliveira e Hilda Ferreira Moraes de Oliveira, nascido em 21 de abril de 1977, na cidade de Firminópolis-Goiás-Brasil.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, PB, Brasil, em julho de 1998, concluindo sua graduação em outubro de 2003.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	10
4.2. ADMINISTRAÇÃO DE GLICOCORTICÓIDES	12
4.3. COLETA DE MATERIAL PARA ANALISES	12
4.3.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA	12
4.3.2. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	12
4.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSSÃO	19
7. CONCLUSÕES	23
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	24
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Corte longitudinal, ao longo da cabeça do fêmur. Adaptado de WRONSKY & SHEN , 1997.	12
Figura 2	Corte transversal da diáfise do fêmur. Adaptado de: PARFITT et al., 1987.	12
Figura 3	Extremidade proximal do fêmur mostrando a arquitetura óssea preservada, onde se observa a conectividade desejável entre as trabéculas (setas). H.E. 40x.	14
Figura 4	Animal do grupo IV. Trabéculas metafisiárias com presença de osteócitos com núcleo condensado (setas). H.E.200x.	14
Figura 5	Animal do grupo II. Trabéculas metafisiárias com superfícies lisas e com ausência de osteoblastos. H.E. 200x.	14
Figura 6	Animal do grupo III. Trabéculas metafisiárias com osteócitos com núcleos condensados (setas). H.E. 400x.	14

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Distribuição dos grupos experimentais nas diferentes datas de coleta.	11
Tabela 2	Comparação entre os valores médios (em μm) para a variável Espessura da Cortical entre os diferentes tratamentos.	16
Tabela 3	Comparação entre os valores médios (em %) para Porosidade entre os diferentes tratamentos.	17
Tabela 4	Comparação entre os valores médios (em %) para a variável Volume Trabecular Ósseo nos diferentes tratamentos.	17

RESUMO

MORAES, Fabio Pires de. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Analises histológica e morfométrica no fêmur de ratas (*Rattus norvegicus*) com osteoporose induzida.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio, Co-Orientadores: Andréa Pacheco Batista Borges e Ricardo Junqueira Del Carlo.

A osteoporose é uma doença debilitante, muito comum, que torna os ossos frágeis e propensos a fraturas. Provoca dor, perda dos movimentos, dificuldades para executar as tarefas diárias e em muitos casos até a morte. É caracterizada por fragilidade óssea, com diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do esqueleto, levando a uma acentuada perda óssea e a um conseqüente aumento da susceptibilidade a fraturas. Atualmente considera-se a osteoporose como um dos maiores e mais preocupantes problemas de saúde do mundo, que atinge homens e mulheres. Este trabalho tem como objetivo verificar se as alterações histológicas e histomorfométricas decorrentes da osteopenia causada pela castração, da administração de corticóides e da associação dos dois tratamentos são condizentes com as alterações verificadas na osteoporose. Para realização do experimento foram utilizadas 80 ratas adultas. Os animais foram divididos em quatro grupos de 20 animais em cada: grupo I – controle; grupo II – Ratas castradas; grupo III – Tratamento com glicocorticóide; grupo IV – Ratas castradas e recebendo tratamento com glicocorticóide. As coletas foram realizadas em todos os grupos aos 14, 28, 42 e 56 dias após o início da administração do glicocorticóide, concluiu-se que o modelo no qual se usa a associação da castração juntamente com a administração de glicocorticóides em ratas induz alterações ósseas compatíveis com as descritas na osteoporose.

ABSTRACT

MORAES, Fabio Pires de. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2006. **Histological and morphometric analyses in femur of female rats (*Rattus norvegicus*) with induced osteoporosis.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio, Co-Advisers: Andréa Pacheco Batista Borges and Ricardo Junqueira Del Carlo.

The osteoporosis is disease debility, very common, that turns the fragile and prone bones to you fracture. It provokes pain, loss of the movements, difficulties to execute the tasks of the day by day and in many cases until the death. It is characterized by bony fragility, with decrease of the bony mass and deterioration of the microarchitecture of the skeleton, taking the one accentuated bony loss and to a consequent increase of the susceptibility to you fracture. Now he/she is considered the osteoporosis as one of the largest and more preoccupying problems of health of the world that reaches men and women. This work has as objective verifies alterations current histological and histomorphometrical of the osteopenia caused by the castration, of the corticoids administration and of the association of the two treatments they are suitable with the alterations verified in the osteoporosis. For accomplishment of the experiment 80 adult female rats were used. The animals were divided in four groups with 20 female rats in each: group I - control; group II - castrated; group III - glucocorticoid group IV -castrated with glucocorticoid therapy. The collections were accomplished in all the groups to the 14, 28, 42 and 56 days after the beginning of the administration of the glucocorticoid, concluded that the model in which is used the association of castration with administration of glucocorticoids in rats induces similar changes with the described ones in osteoporosis.

1 - INTRODUÇÃO

Devido ao aumento na expectativa de vida das populações mundiais, a osteoporose é atualmente reconhecida como um importante problema em termos de saúde pública. É a doença óssea mais comum, afetando pelo menos 30% de todas as mulheres na pós-menopausa e seu estudo tem sido motivado em decorrência da morbidade e mortalidade dos indivíduos portadores desta patologia (UDDO, 1997, LANNA et al., 2003).

De acordo com uma pesquisa nacional a respeito de saúde e nutrição, realizada na Argentina, 55% das mulheres entre 50 e 59 anos de idade apresentaram redução da densidade mineral óssea (DMO), taxas estas que aumentam para 69-88% quando se trata de mulheres com idade entre 60 e 70 anos, o que ilustra a importância de se conhecer mais sobre a osteoporose: sua prevenção, diagnóstico precoce e fatores de risco associados (ENRIORI & ENRIORI, 2002).

Dados alarmantes sobre a osteoporose foram apresentados em 2000 no Congresso Mundial da Fundação Internacional de Osteoporose (IOF), mostrando que cerca de 200 milhões de pessoas no planeta estão sofrendo com a osteoporose (IOF, 2004).

A osteoporose é responsável, anualmente, por mais de 1,5 milhões de fraturas (uma em cada quatro mulheres após os 65 anos), incluindo: 300 mil fraturas de quadris, 700 mil fraturas vertebrais, 250 mil fraturas de punho e

300 mil fraturas em outros ossos. Pode-se afirmar que uma em cada duas mulheres e um a cada oito homens com idade acima de 50 anos terá fratura relacionada à osteoporose durante o seu tempo de vida (SIMÕES et al., 2001). Ainda segundo estes mesmos autores, a estimativa nacional direcionada ao gasto com osteoporose (hospitais e enfermeiras particulares) e fraturas associadas é de US\$13,8 bilhões (US\$38 milhões ao dia) e o custo continua aumentando.

No modelo experimental de osteoporose desenvolvido por SANTOS (2004) se constatou que a deficiência de estrógenos associada com o uso de glicocorticóides induz alterações ósseas compatíveis com osteoporose em fêmeas adultas ovariectomizadas, assim pretende-se dar continuidade a esse trabalho analisando e mensurando a perda óssea no fêmur de ratas (*Rattus norvegicus*) com osteoporose induzida pela castração e pela administração de glicocorticóides.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar por meio de análises histológica e morfométrica a osteopenia induzida pela esterilização (ovariectomia) e pela administração de glicocorticóide (dexametasona) em ratas adultas.

2.2 - Objetivos Específicos

2.2.1. Analisar, de forma descritiva as alterações histológicas.

2.2.2. Mensurar e avaliar a espessura da cortical (EC), o diâmetro do osso (DO), o diâmetro da medular (DM), o volume trabecular ósseo (VTO) e porosidade óssea (PO).

3- REVISÃO DE LITERATURA

O osso é um tecido dinâmico em constante renovação, cuja integridade depende do equilíbrio entre processos anabólicos (aposição) e catabólicos (reabsorção), o que significa que a perda deste equilíbrio altera a matriz e a mineralização óssea (SERAKIDES et al., 2004).

O osso é o tecido conjuntivo que dá suporte aos vertebrados, é um tecido altamente especializado e dinâmico, difere dos outros tipos de tecido conjuntivo pelo seu elevado conteúdo mineral, o qual é responsável pela sua dureza e rigidez. Os componentes celulares do osso consistem de células precursoras osteogênicas, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e elementos hemocitopoiéticos da medula óssea. As três primeiras sendo responsáveis pela formação, reabsorção e remodelagem do osso e são influenciadas por vários hormônios, fatores de crescimento, vitaminas e minerais da dieta (MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000; KALFAS, 2001).

A arquitetura da maioria dos ossos é semelhante, sendo composta de osso do tipo trabecular (esponjoso) e do tipo lamelar (cortical) (MUNDY, 2000). No osso esponjoso, as trabéculas de tecido ósseo mineralizado se interconectam formando uma rede resistente a cargas mecânicas, e são continuamente remodeladas nas superfícies endosteais,

os espaços vazios entre estas são preenchidos pela medula óssea. (KALFAS, 2001).

O osso cortical apresenta-se de forma compacta ao redor do componente trabecular e contribui para a manutenção da sua integridade estrutural (UDDO, 2002).

Os tecidos ósseos, esponjoso e lamelar, encontram-se em diferentes proporções dependendo da forma do osso. Segundo a sua morfologia, os ossos são classificados em longos, curtos, planos e irregulares. Os ossos longos como o fêmur, por exemplo, têm as extremidades denominadas de epífises e sua extensão de diáfise e a porção da epífise diretamente contígua à diáfise é chamada metáfise. No caso dos ossos longos, as epífises e metáfises possuem maior quantidade de osso do tipo trabecular e menor quantidade de osso do tipo compacto, enquanto na diáfise ocorre o contrário (DUKES, 1996).

Além das diferenças estruturais, estes dois tipos de tecido ósseo diferem também quanto a outros aspectos, como a distribuição espacial das células, a densidade da matriz mineralizada, a distribuição dos vasos sanguíneos e da medula óssea. Em ambos os tipos, osteoblastos e osteoclastos movem-se livremente sobre a superfície, sendo que os primeiros podem ser embebidos pela matriz, dando origem aos osteócitos. Em função de sua maior superfície por volume, o osso trabecular é metabolicamente mais ativo que o cortical (VIEIRA, 2004).

Os osteoblastos são células metabolicamente ativas e formadoras de osso. Eles estão envolvidos no controle da concentração extracelular de cálcio e fósforo, bem como na adaptação à remodelação pela interação célula-célula no ambiente local. Secretam osteóide, uma matriz orgânica não mineralizada que posteriormente sofrera mineralização dando ao osso força e rigidez, e também exercem um importante papel na reabsorção óssea, ativando os osteoclastos. Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, encontradas próximas à superfície óssea, possuem a capacidade de reabsorver tecidos mineralizados por mecanismos celulares e hormonais (KALFAS, 2001).

A remodelação óssea é um processo de equilíbrio constante entre a reabsorção e a formação óssea (*turnover* ósseo). Este processo é mantido

por um complexo sistema de controle. Uma série de condições como idade, doenças ósseo-metabólicas, mobilidade diminuída, ação de algumas drogas, etc, podem alterar este equilíbrio entre formação e reabsorção, levando ao predomínio de uma sobre a outra, com conseqüências metabólicas (hiper ou hipocalcemia) e/ou mecânicas como a osteoporose (ARISAWA et al. 2000; VIEIRA, 2004).

A osteoporose é uma doença debilitante, muito comum, que torna os ossos frágeis e propensos a fraturas. Provoca dor e perda dos movimentos, dificuldades para executar as tarefas do dia-a-dia e, em muitos casos, até a morte (IOF, 2004). É caracterizada por fragilidade óssea, com diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do esqueleto, levando a uma acentuada perda óssea e a um conseqüente aumento da susceptibilidade a fraturas. Atualmente, considera-se a osteoporose como um dos maiores e mais preocupante problemas de saúde pública do mundo, que atinge tanto aos homens quanto às mulheres (SANTOS, 2004; ENRIORI & ENRIORI, 2002).

Fisiologicamente, o tecido ósseo é continuamente depositado por osteoblastos e reabsorvido nos locais onde os osteoclastos estão ativos. Normalmente, com exceção dos ossos em crescimento, há equilíbrio entre deposição e reabsorção óssea; na osteoporose, ocorre uma desproporção entre as atividades osteoblástica e osteoclástica, com predomínio da última (GALI, 2001).

Ainda, segundo esse autor, a osteoporose pode ser classificada como primária ou idiopática e secundária. A forma primária é classificada em tipo I e tipo II. No tipo I, também conhecida como tipo pós-menopausa, ocorre perda óssea rápida e acomete a mulher que atingiu recentemente a menopausa. Afeta predominantemente o osso trabecular, e está associada a fraturas das vértebras e da região distal do rádio. O tipo II, ou senil, relaciona-se com o envelhecimento, e aparece por deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea.

A osteoporose secundária é decorrente de processos inflamatórios, como a artrite reumatóide, alterações endócrinas como hiperparatireoidismo e desordens das adrenais, mieloma múltiplo, por desuso e por uso de drogas

como heparina, álcool, vitamina A e glicocorticóides. Estes fatores inibem a absorção intestinal do cálcio e aumentam sua eliminação urinária, diminuem a formação osteoblástica e aumentam a reabsorção osteoclástica (COHEN & ROE, 2000; GALI, 2001).

Os glicocorticóides (GCs) são fármacos freqüentemente utilizados na prática médica, por suas indiscutíveis ações antiinflamatórias e imunossupressoras (GUTIÉRREZ-POLO, 2003). Entretanto, segundo este mesmo autor, o principal efeito adverso de sua administração sistêmica e prolongada é a osteoporose secundária.

LANNA et al. (2003) consideram que concentrações fisiológicas de GCs são necessárias. Porém, a exposição crônica a doses excessivas de cortisol endógeno ou a doses farmacológicas de GCs podem causar diversos efeitos deletérios à estrutura e à função do osso, tais como osteopenia e osteoporose, podendo levar a fraturas ósseas.

Atualmente, se considera que os GCs causam osteoporose devido, principalmente, à ação direta sobre os osteoblastos, já que neles se têm demonstrado receptores (GRs) para GCs. Isto se constitui em mais uma evidência de que estas células centralizam o controle da remodelação óssea, tanto de forma autócrina, produzindo citocinas e expressando receptores que estimulam sua própria atividade, como de forma parácrina, produzindo fatores de crescimento que inibem ou estimulam a atividade dos osteoclastos (CANALIS & GIUSTINA, 2001).

Segundo MANELLI & GIUSTINA (2000), a osteoporose induzida pela ação dos GCs é devido à inibição da replicação da linhagem de osteoblastos, diminuição da gênese de novas células osteoblásticas e indução da morte dos osteoblastos e osteócitos por apoptose, diminuindo assim a capacidade de formação de novo osso. Ainda, segundo WEINSTEIN & MANOLAGAS (2000) um aumento no processo de apoptose de osteoblastos, de pelo menos três vezes, pode resultar em perda de até 90% dos osteoblastos ativos. Além disso, a administração crônica de GCs também aumenta a morte por apoptose de osteócitos.

Por outro lado, LANNA et al (2003) afirmam que a perda óssea induzida pelos GCs também se deve à ação sobre os osteoclastos,

produzindo um efeito negativo para a remodelação óssea, estimulando a reabsorção de forma direta ou ainda aumentando a secreção do PTH.

A apoptose dos osteócitos poderia ser o principal fator de osteopenia induzida pelos GCs, devido às importantes funções que estas células exercem na qualidade óssea, podendo explicar o rápido aumento do risco de fraturas que se produz quando se inicia a terapia com estes fármacos (GUTIÉRREZ-POLO, 2003). Este mesmo processo tem sido sugerido como o principal mecanismo de geração da osteonecrose (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000).

Um outro fator, considerado muito importante para o equilíbrio do metabolismo ósseo, são os hormônios sexuais femininos, que atuam na remodelação óssea por mecanismos que ainda hoje não estão bem esclarecidos. A presença de receptores para o estrógeno nos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, bem como nas células osteoprogenitoras da medula óssea sugerem uma ação direta desses hormônios sobre o osso. O estrógeno nos osteoblastos regula a expressão dos genes que codificam o colágeno do tipo I, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. Estimula, também, a diferenciação dos osteoblastos e a síntese de matriz óssea. Além disso, em um outro mecanismo regulador da remodelação óssea ele estimula a apoptose dos osteoclastos e mantém viáveis os osteócitos (SERAKIDES et al, 2004).

Na deficiência dos esteróides sexuais, parece ainda ocorrer uma diminuição da massa óssea em função de uma redução na absorção intestinal de cálcio, devido a sua ação direta sobre a mucosa intestinal e indireta sobre a vitamina D. Essa deficiência de esteróides diminui os receptores de vitamina D no intestino e é responsável por uma menor conversão do 25 hidroxicolecalciferol (25OHD₃) na forma ativa da vitamina D, o 1,25 dihidroxicolecalciferol (1,25(OH₂)D₃) (RIBEIRO 2003).

Segundo THOMPSON et al. (1995), o mecanismo atualmente aceito para a perda óssea observada em ratas ovariectomizadas é a deficiência de estrógeno causando um desbalanceamento no *turnover* ósseo, com a reabsorção excedendo a formação óssea. Segundo estes autores, os efeitos da ovariectomia iniciam-se ao redor de 14 dias após a cirurgia, com o

aumento do *turnover* e da reabsorção óssea, levando a um decréscimo significativo do volume trabecular ósseo.

Entretanto, TANIZAWA et al. (2000) constataram que a perda óssea em ratas ovariectomizadas se inicia cinco dias após a cirurgia e a relação entre o volume ósseo e o volume trabecular diminui com o tempo, sendo menor do que o observado nas ratas não ovariectomizadas 30 dias após cirurgia.

Como previamente descrito, na osteoporose pela deficiência de estrógeno, as alterações histológicas mais frequentemente observadas dizem respeito à formação óssea, principalmente nos locais onde há osso esponjoso. Assim, nas bordas trabeculares, as camadas de osteoblastos e de osteoclastos apresentam-se descontínuas ou, às vezes, podem estar cobertas por uma fina camada de osteoblastos inativos. Isto também foi relatado por HAM em 1952 apud CALDWELL (1962), nos locais em que está ocorrendo reabsorção osteoclástica, embora no caso da osteoporose os osteoclastos não sejam freqüentemente constatados na vizinhança dessas trabéculas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do experimento foram utilizadas 80 ratas adultas (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 300g, oriundas do Biotério da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O experimento foi conduzido no Laboratório de Biofármacos/UFV, em uma sala climatizada, com controle de temperatura (20 - 24°C), umidade relativa do ar (45 – 70%) e de fotoperíodo (12 horas). Os animais permaneceram em ambientação nesta sala durante uma semana.

4.1 - Distribuição dos grupos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com 20 animais em cada grupo (Tabela 1).

O experimento foi conduzido em gaiolas, com cinco ratas em cada, forrado com cama de maravalha estéril (autoclavada). As gaiolas foram lavadas 2 a 3 vezes por semana e a cama substituída. Os animais receberam ração comercial (Labina-Purina) e água *ad libitum*.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais nas diferentes datas de coleta.

Coleta	Dias				Total
	14	28	42	56	
Grupo I					
Fêmeas controle	5	5	5	5	20
Grupo II					
Fêmeas castradas	5	5	5	5	20
Grupo III					
Fêmeas tratadas com glicocorticóide	5	5	5	5	20
Grupo IV					
Fêmeas castradas tratadas com glicocorticóide	5	5	5	5	20
Total	20	20	20	20	80

Em seguida, os animais dos grupos II e IV foram submetidos à cirurgia de esterilização, a qual foi realizada sob anestesia geral com tiletamina-zolazepam (ZOLETIL[®] 50 - Virbac), na dose de 30 mg/kg de peso vivo, via intramuscular. Após a incisão retroumbilical da pele e do tecido subcutâneo a linha alba foi incisada, para permitir o acesso à cavidade abdominal. Foram realizadas duas ligaduras, uma em cada pedículo ovariano com fio de algodão 10-0 e, em seguida, estes foram seccionados. Foram realizadas duas linhas de sutura com fio não absorvível (náilon 0,25) envolvendo peritônio e musculatura; tecido subcutâneo e pele.

Imediatamente após o ato cirúrgico, todos os animais receberam antibiótico (Oxirat-La[®] - Vallée) na dosagem de 5 g/kg por via intramuscular, repetida por mais dois dias consecutivos.

4.2 - Administração de Glicocorticóide

Aos 15 dias após o procedimento cirúrgico os animais dos grupos III e IV receberam uma dose de 7 mg/kg de dexametasona (Azium[®] - Schering-Plough) por semana, via intramuscular, durante quatro semanas.

4.3 - Coleta de Material para Análises

As coletas foram realizadas em todos os grupos aos 14, 28, 42 e 56 dias após o início da administração do glicocorticóide.

Os animais foram eutanasiados por sobre-dose de anestésico inalatório em câmara de gás com éter etílico. Em seguida realizou-se a necropsia e coleta do fêmur.

4.3.1 - Análise histológica

Os fêmures dos animais foram coletados, seccionados em dois fragmentos, sendo o primeiro longitudinal, entre a cabeça do fêmur e o trocânter maior, permitindo assim observar a região do colo do fêmur (Figura 1), como indicado por (WRONSKI & SHEN 1997). O segundo fragmento foi transversal, sendo realizado na região da diáfise (Figura 2), conforme sugerido por PARFITT et al. (1987).

Os fragmentos foram fixados em formol a 10%, neutro tamponado pH 7,4 por um período de 24 horas, sendo então descalcificados e processados rotineiramente para análise histológica.

Foram analisadas as características histológicas gerais do osso, das trabéculas, osteoclastos, osteoblastos e osteócitos quanto à perda óssea.

4.3.2 - Análise histomorfométrica

Para avaliação histomorfométrica, os cortes processados histologicamente foram analisados através do sistema para análises de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 do Laboratório de Anatomia

Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. As imagens foram digitalizadas utilizando um microscópio NIKON Eclipse E600 com ocular de 10x e objetiva de 4x, câmera digital NIKON HC300ZI e programa Fotograb-300Z, do Departamento de Veterinária/UFV.

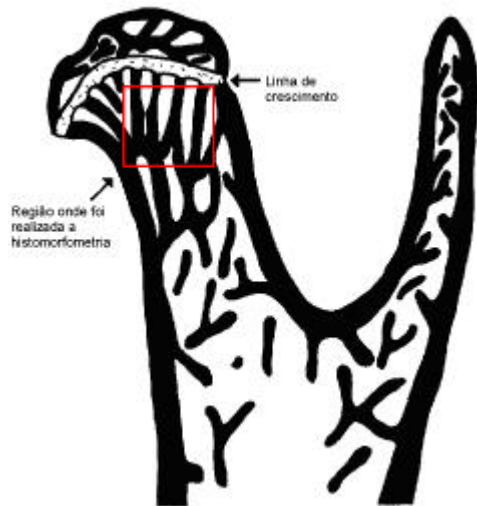


Figura 1. Corte longitudinal, ao longo da cabeça do fêmur. Adaptado de WRONSKY & SHEN , 1997.

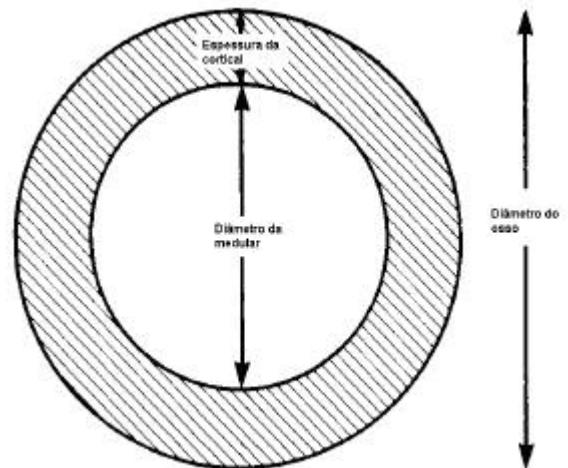


Figura. 2. Corte transversal da diáfise do fêmur. Adaptado de: PARFITT et al., 1987.

As análises foram realizadas em uma área de 100 μm quadrados, logo abaixo da linha de crescimento. Foi analisado o diâmetro do osso (DO), diâmetro do canal medular (DM), espessura da cortical (EC), medidos em micrometros (μm), segundo Parfitt et. al. (1987). Já a porosidade (PO) e o volume trabecular ósseo (VTO) foram expressos em porcentagem, segundo Raffi et al (1997).

Para as variáveis DO, DM e EC foram feitas cinco medições em várias direções, garantindo assim uma maior fidelidade dos resultados encontrados, usando-se a média simples como resultado.

Para as medições de PO e VTO utilizou um “Grid Mask” contendo 121 pontos e o valor final foi obtido pelas seguintes fórmulas, como descrito por Raffi et. al. (1997):

$$\text{Porosidade} = \frac{\text{número de pontos em cavidades} \times 100}{\text{Número total de pontos}}$$

$$\text{Volume trabecular ósseo} = \frac{\text{número de pontos sobre o osso trabecular} \times 100}{\text{Número total de pontos}}$$

4.3.3 - Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade de Lilliefors e Homocedasticidade de Cochran e posteriormente a análise de variância. Quando havia significância se realizava o teste de comparação de médias de Duncan (SAEG, 1999).

5 - RESULTADOS

No fêmur dos animais de todos os grupos experimentais se observou fechamento da placa de crescimento. Durante todo o período do experimento, nos animais do grupo I as características histológicas ósseas se apresentaram normais (Figura 3), principalmente respeito à conformação do osso esponjoso, o qual não mostrava perda de conectividade trabecular, com osteoblastos e osteócitos ativos. As áreas de remodelação trabecular mostravam lacunas onde os osteoclastos faziam a reabsorção e os osteoblastos a deposição de matriz óssea não mineralizada (osteóide).

Nos grupos II, III e IV aos 14 e 28 dias se observou perda da microarquitetura óssea (Figura 5), isto é notava-se perda de conectividade entre as trabéculas tanto da esponjosa primária quanto da secundária, aparentemente mostrando menor quantidade de osteócitos, embora não foi constatada a presença de lacunas vazias e alteração de matriz. Os osteócitos mostravam núcleos compactos e intensamente corados nas trabéculas metafisiárias (Figura 4), especialmente naquelas mais próximas à placa de crescimento (esponjosa primária), do fêmur dos animais dos grupos III e IV, sendo que a fragmentação nuclear também estava presente no grupo IV (Figura 5). Às vezes se observou esta mesma alteração nuclear no osso subcondral.

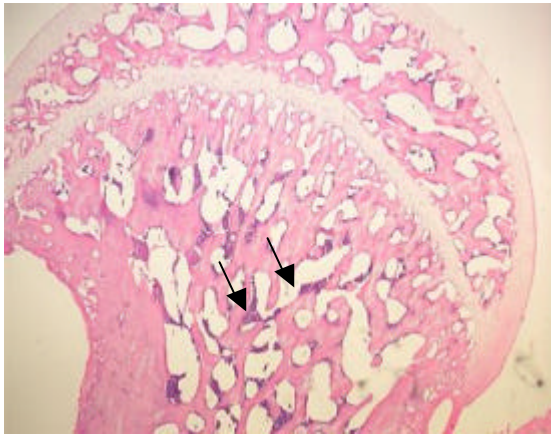


Figura 3. Extremidade proximal do fêmur mostrando a arquitetura óssea preservada, onde se observa a conectividade desejável entre as trabéculas (setas). H.E. 40x.

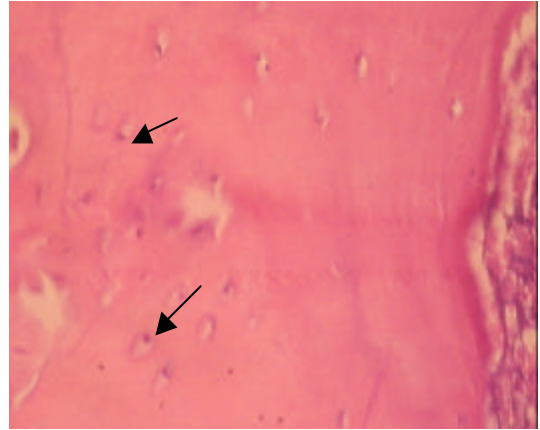


Figura 4. Animal do grupo IV. Trabéculas metafisiárias com presença de osteócitos com núcleo condensado (setas). H.E.200x

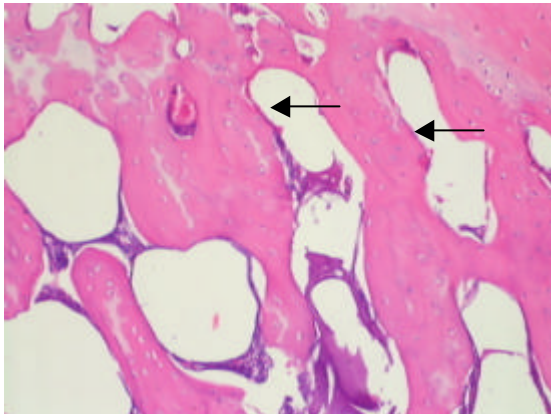


Figura 5. Animal do grupo II. Trabéculas metafisiárias com superfícies lisas e com ausência de osteoblastos. H.E. 200x.

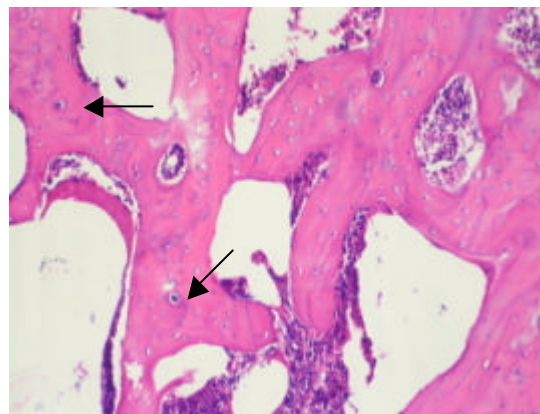


Figura 6. Animal do grupo III. Trabéculas metafisiárias com osteócitos com núcleos condensados (setas). H.E. 400x.

Além disso, nestes grupos algumas trabéculas mostravam superfícies lisas e com ausência de osteoblastos, não se observando mobilização de osteoclastos. No osso compacto não se observaram alterações histológicas evidentes.

Aos 42 e 56 dias, estas mesmas alterações estavam presentes nesses grupos, porém com menor intensidade nos grupos II e III.

Os resultados obtidos na avaliação histomorfométrica dos parâmetros diâmetro do osso (DO) e diâmetro da medular (DM), não foram estatisticamente significativos entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Igualmente, não houve diferença estatística significativa quando se compararam as médias obtidas nas diferentes coletas para um mesmo grupo e entre os diferentes grupos para as variáveis mensuradas.

Os valores obtidos a partir da mensuração da espessura da cortical (EC) para os diferentes tratamentos mostraram diferença estatística significativa quando se compararam os grupos I e II com os grupos III e IV (tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre os valores médios (em μm) para a variável Espessura da Cortical entre os diferentes tratamentos.

Grupos	Amostra	Médias
I	20	4.5405 A*
II	20	4.4035 AB
III	20	4.0920 BC
IV	20	4.0500 C

*Médias dos tratamentos com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Na tabela 3 são apresentados os valores obtidos a partir da análise do parâmetro porosidade (PO). A diferença estatística significativa entre o grupo IV e os demais indica que a perda óssea neste grupo foi maior.

Tabela 3. Comparação entre os valores médios (em %) para Porosidade entre os diferentes tratamentos.

Grupos	Amostra	Médias
I	20	44.3010 A
II	20	43.7555 A
III	20	41.4680 A
IV	20	50.4490 B*

*Médias dos tratamentos com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Quando se comparam as médias para a variável volume trabecular ósseo (VTO) nos diferentes grupos, constatou-se que houve diferença estatística significativa, sendo que o grupo IV apresentou menor volume trabecular (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre os valores médios (em %) para a variável Volume Trabecular Ósseo nos diferentes tratamentos.

Grupos	Amostra	Médias
I	20	55.7485 A
II	20	56.2345 A
III	20	58.6840 A*
IV	20	49.5415 B

*Médias dos tratamentos com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

6 - DISCUSSÃO

As alterações histológicas que foram observadas no fêmur dos animais dos grupos II, III e IV são semelhantes às aquelas descritas para a osteoporose, confirmando-se mais uma vez que o modelo murino, no qual se associa a castração com a administração de glicocorticóides leva a alterações ósseas compatíveis com as que têm sido descritas na osteoporose em humanos (THOMPSON et al., 1995; TANIZAWA et al. 2000; SANTOS, 2004).

A perda da microarquitetura óssea observada nesses grupos aos 14 e 28 dias após tratamentos, caracterizada pela perda de conectividade trabecular pode ser explicada pelo próprio mecanismo de remodelação, o qual é desequilibrado por fatores como deficiência de estrógenos e o tratamento com GCs, levando como consequência a redução na formação óssea e/ou aumento da reabsorção.

O aparecimento de alterações indicativas de perda óssea aos 14 dias, em ratas ovariectomizadas, também foi observado em estudos anteriores por THOMPSON et al. (1995).

O fato de que essa perda da microarquitetura tenha sido observada na metáfise, deve-se ao fato de que o osso trabecular é metabolicamente mais ativo do que o osso compacto, conforme afirmam ARISAWA et al. (2000) e VIEIRA (2004).

RIGGS (1991) afirma que a perda óssea pós-menopausa devido à deficiência de estrógeno leva a uma perda desproporcional entre o osso cortical e o trabecular, sendo maior neste último. Ainda, as observações de BYERS et al. (1999) confirmam que esta alteração é mais freqüente (81,5%) no osso esponjoso, em pacientes humanos com osteoporose. Sendo assim, pode-se inferir que no modelo animal aqui utilizado também se produzem as mesmas alterações nesse local.

A perda de conectividade trabecular, no caso do fêmur dos animais do grupo II, possivelmente foi decorrente da falta de estímulo sobre a proliferação e atividade osteoblástica, que foi constatado quando se observaram trabéculas com as bordas lisas e às vezes com osteoblastos fusiformes, alterações estas que são consistentes com a deficiência de estrógenos, que também foram observadas por BYERS et al. (1999).

Entretanto, não se deve descartar o papel dos osteoclastos, embora não tenham sido observados com freqüência na vizinhança dessas trabéculas, já que segundo OTT (1998) “perfurações” de trabéculas individuais ocorrem quando as cavidades reabsorvidas estão muito profundas, sendo este tipo de alteração observada no caso de deficiência de estrógeno. Assim, as trabéculas remanescentes não são bem conectadas às outras e são mecanicamente frágeis o que aumenta o risco de fraturas pela perda da qualidade óssea.

Considerando que GRs foram demonstrados nos osteoblastos, pode-se sugerir que a perda óssea observada no fêmur dos animais do grupo III também seria decorrente da ação inibitória sobre estas células, bem seja porque houve inibição da replicação ou aumento da apoptose, levando como consequência a diminuição da população celular responsável pela formação óssea, o que também já foi descrito por MANELLI & GIUSTINA (2000), WEINSTEIN & MANOLAGAS (2000) e CANALIS & GIUSTINA, (2001), GUTIÉRREZ-POLO (2003).

Já no caso do grupo IV, provavelmente ocorreu um efeito acumulativo dos dois tratamentos, uma vez que o efeito anti-apoptótico do estrógeno sobre osteoblastos e osteócitos, não estava presente, facilitando a ação apoptótica dos GCs sobre estas células, o que segundo GUTIÉRREZ-POLO (2003) é a chave para a ação dos glicocorticóides.

O anteriormente discutido se baseia no fato de que nestes grupos, os osteócitos mostravam características histológicas compatíveis com apoptose, não se observando alteração da matriz e nem lacunas vazias indicativas de osteonecrose e não houve constatação de maior mobilização de osteoclastos.

A persistência das alterações histológicas em menor intensidade no fêmur dos animais dos grupos II e III, aos 42 e 56 dias está de acordo com estudos que relatam que a deficiência de estrógeno causa uma fase inicial de perda óssea acelerada seguida de uma fase em que esta perda é mais lenta (RIGGS, 1991). Por outro lado, os glicocorticóides atuam alterando a remodelação óssea e o metabolismo do cálcio, induzindo duas fases de perda óssea: uma fase inicial, na qual ocorre uma perda rápida e acentuada (reduz a taxa de formação e aumenta a de reabsorção), e uma segunda fase, na qual a perda óssea é mais lenta (taxa de formação reduzida e a taxa de reabsorção também se reduz) (RIGGS et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

As análises histomorfométricas corroboram as alterações histológicas que foram observadas no fêmur dos animais dos grupos II, III e IV. Pode-se observar que para a variável espessura da cortical (EC) (Tabela 2) a diferença estatística é significativa para os grupos III e IV, e embora não tenham sido observadas alterações intensas no osso compacto é possível que também tenha ocorrido osteopenia, uma vez que a perda óssea que se observa na osteoporose é diferente dependendo do local onde ela ocorra, o que segundo LI et al. (1995) é devido a um balanço ósseo negativo muito lento nas superfícies endocorticais, o que resulta numa baixa perda do osso cortical.

A maior perda óssea (50,445%) que foi constatada no grupo IV, quando se avaliou o parâmetro PO, pode ser justificada pelo efeito acumulativo dos tratamentos. Isto fica evidente quando se comparam os valores médios obtidos para os grupos I, II e III (Tabela 3), indicando que essa perda óssea provavelmente ocorreu por “perfurações” que levaram à perda da microarquitetura, o que está de acordo com o observado por TANIZAWA et al. (2000). Este resultado pode ser confirmado quando se analisa a Tabela 4, para a variável VTO, que expressa a quantidade de osso

trabecular preservado, mostrando que no grupo IV houve uma significativa diminuição do volume trabecular, alterações estas justificadas pela ação osteopenisante dos glicocorticóides e da ovariectomia, o que está de acordo com as alterações descritas por (GUTIÉRREZ-POLO 2003; SERAKIDES et al, 2004).

Nos estudos de SANTOS (2004), esta maior fragilidade dos ossos de ratas ovariectomizadas tratadas com glicocorticóides também ficou evidente quando da realização dos testes biomecânicos sobre rigidez e flexão, sugerindo que o somatório dos efeitos desse tratamento exerceu ação negativa sobre a fragilidade óssea e conseqüentemente redução na resistência à fratura por flexão.

7- CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos através das análises histológicas e histomorfométricas realizadas no presente estudo pode-se concluir:

A histologia confirma a eficiência deste modelo experimental para o estudo da osteoporose.

A análise histomorfométrica demonstrou que após a ovariectomia ocorre perda óssea em ratas.

A ovariectomia associada ao tratamento com glicocorticóide em ratas induz alterações ósseas compatíveis com a Osteoporose.

A mais evidente das alterações histológicas era a morte celular de osteócitos, que ocorreu provavelmente por apoptose.

8 - PERSPECTIVAS FUTURAS

O modelo experimental associando os efeitos da deficiência de estrógeno e sobre dose de glicocorticóides induz alterações metabólicas ósseas levando à osteopenia.

É de suma importância levar em consideração ferramentas de diagnóstico por imagem, como a densitometria óssea, que já é bastante utilizada na rotina médica humana, permitindo assim avaliar a densidade mineral óssea.

As análises histomorfométricas e os estudos com marcadores de remodelação óssea são de fundamental importância para o diagnóstico definitivo e um melhor entendimento da fisiopatologia da osteoporose.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARISAWA, E.A.L.; ROCHA, R.F.; CARVALHO, Y.R.; MORAES, E.; ALMEIDA, J. D. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. **Revista Faculdade Odontologia**, São José dos Campos, v.3, n. 1, p.54-59, 2000.

BYERS. R J; DENTON J.; HOYLAND J.A.; FREEMONT A.J. Differential patterns of altered bone formation in different bone compartments in established osteoporosis. **Journal Clinical Pathology**, v.52, p.23-28, 1999.

COHEN, A. J.; ROE, F. J. C. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible etiological role of dietary salt. **Food and Chemical Toxicology**, n. 38, p. 237-253, 2000.

CALDWELL, R. A. Observations on the incidence, etiology, and pathology of senile osteoporosis. **Journal Clinical Pathology**, v. 15, 421 p, 1962.

DUKES, H., HUGH. Fisiologia dos animais domesticos. 11^a Ed. RJ, **Editora Guanabara**, 1996.

ENRIORI, J.P. & ENRIORI, L.C. The pathogenesis of osteoporosis in women and men: a review. **The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. n.1, p.1-6, 2002.

GALI, J. C. Osteoporose. **Revista Acta Ortopédica Brasileira**, v.9, n 2, p.53-62, 2001.

GUTIERREZ PÓLO, Osteoporosis inducida por glucocorticoides, **Anales Sistema Sanitário de Navarra**. V. 26, Suplemento 3, p.63-80, 2003.

INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION - IOF. Densitometria mineral óssea confirmada como um indicador chave para o risco de fraturas. Rio de Janeiro, Brasil, p. 01-04, 2004.

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgery Focus**, v. 10, p. 1-4, 2001.

WRONSKY, T. J., Y; SHEN L.M., Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n° 1, p. 55 -61,1997.

LANNA, C. M.M.; MONTENEGRO JR.; RENAN, M.; PAULA, F., J.A. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 47, n. 1, p.9-18, 2003.

LI, M.; DANIELSEN, C.C.; SØGAARD, C.H.; McOSKER, E.J.; WRONSKI, T.J. The anabolic effects of parathyroid hormone on cortical bone mass, dimensions and strength-assessed in a sexually mature ovariectomized rat model. **Bone** v. 16, n.16, p. 223-230, 1995.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n.2, p. 115–137, 2000.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A., Glicocorticoid-induced Osteoporosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, n. 3, 2000.

MUNDY, G. R. Pathogenesis of osteoporosis and challenges for drug delivery., **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 42, p. 165–173, 2000.

OTT, S. Osteoporosis and bone physiology. 1998.
(<http://uwcme.org/courses/bonephys>)

PARFITT, A., MICHEL; DREZNER, K. M.; GLORIEUX, H. F.; KANIS, JOHN A., M.; HARMUT, M.; PIERRE J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standartization of nomenclature, symbols, and units. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 2, n 6, 1987.

RAFFI, M.B.; MENDEZ, CARMEN; M.D.; RIET-CORREA, F., estudos histomorfométricos e histológico das lesões ósseas causadas por flúor em aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17, n. 2, p. 69-76, 1997.

RIGGS B. L. Overview of Osteoporosis, **West Journal Medicine**, v. 154, p. 63-7, 1991.

RIGGS, B. L; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 3, p. 279–302, 2002.

ROSEN. J.C. Pathogenesis of osteoporosis, **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 181-193, 2000.

RIBEIRO, A.F. C.; SERAKIDES, R.; NUNES A.V.; SILVA, C.M.; OCARINO, N.M., A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**., v. 47, n.3, p. 22-236, 2003.

RUBIN, M. R.; BILEZIKIAN, J. P. The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. Clinical review. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 87, n. 9, p. 4033-4041, 2002.

SANTOS, P. S.. Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose. Viçosa-MG, UFV, 2004, 45p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2004.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; OCARINO, N.M.; NASCIMENTO, E.F. Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 48, n. 6, p. 875-884, 2004.

Sistema de análise estatística e genética (**SAEG**), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa-M.G., 1999.

SIMÕES, O.M.C, CARVALHO, G.J.; MORAIS, M.B.M., Osteoporose dados estatísticos. Disponível em http://www.saudeemmovimento.com.br/conteudo_frame.asp?cod_noticia=60 (acesso em 11/08/2004)

TANIZAWA, T. , YAMAGUCHI, A.; UCHIYAMA, Y.; MIYAURA, C.; IKEDA, T.; EJIRI, S.; NAGAI, Y.; YAMATO, H.; MURAYAMA, H.; SATO, M.; T. NAKAMURA, T. Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. **Bone**. v. 26, n.1, p. 43-53, 2000.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, A.H.; PIRIE, M.C; KE, Z.H., FDA guidelines and animals models for osteoporosis, **Bone**, Supplement, v.17, n. 4 , p.125-133, 1995.

UDDO – Unidade de Diagnóstico e Densitometria Óssea, Osteoporose - Informações para Médicos, 1997, (www.uddo.com/osteoporose), 2002.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2000.

VIEIRA, J.G.H., < jose.vieira@fleury.com.br >, Exames e métodos laboratoriais relacionados com o metabolismo ósseo, 2000, disponível em <http://www.fleury.com.br/htmls/capitulo1.htm> (acesso em 11/08/2004)