

Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas

The influence of local delivery of alendronate sodium on regeneration of calvarial defects in ovariectomized rats

Ana Paula Gumieiro JAIME

Bolsista de Iniciação Científica – Programa PIBIC-CNPq – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Ana Lia ANBINDER

Professora Assistente – Departamento de Odontologia – UNITAU – Taubaté – SP – Brasil
Doutoranda – Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal – Área de Concentração – Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP

Ana Paula de LIMA

Fernanda Almeida PRADO

Aluna de Graduação – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

Ivan BALDUCCI

Professor Assistente – Departamento de Odontologia Social e Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Rosilene Fernandes da ROCHA

Professora Doutora – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP São José dos Campos – SP – Brasil

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do alendronato sódico tópico sobre o reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 24 ratas, que sofreram ovariectomia ou falsa-ovariectomia (cirurgia *sham*) aos três meses de idade e foram submetidas a cirurgia para confecção do defeito de 8mm de diâmetro em calvária aos quatro meses. Os defeitos foram preenchidos com esponja de colágeno reabsorvível embebida em solução de alendronato sódico na concentração de 20mg/mL ou em solução fisiológica (controle). As ratas foram pesadas no momento da ovariectomia, da cirurgia para a confecção do defeito ósseo e do sacrifício, que ocorreu 30 dias depois da cirurgia óssea. Após o sacrifício, as calotas cranianas foram removidas, descalcificadas, submetidas ao preparo histológico de rotina e analisadas histológica e histomorfometricamente (planimetria por contagem de pontos). Para análise estatística, utilizou-se ANOVA ($\alpha=0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas com relação a formação óssea entre os grupos, após a análise histomorfométrica. Histologicamente, todos os grupos também apresentaram-se muito semelhantes, com escassa formação óssea nas bordas da lesão, que estava preenchida por tecido conjuntivo fibroso. As ratas ovariectomizadas apresentaram maior ganho de peso em relação às ratas falso-operadas. Dentro das condições experimentais utilizadas, pôde-se concluir que a ovariectomia e/ou aplicação tópica de alendronato sódico não influenciaram o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calota de ratas e que a ausência de hormônios ovarianos e maior tempo de observação relacionaram-se a um maior ganho de peso dos animais.

UNITERMOS

Alendronato; bifosfonatos; regeneração óssea; ovariectomia; animal; crânio, análise de variância.

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida propiciado, entre outros fatores, pelos avanços obtidos com pesquisas recentes, pela descoberta de novos tratamentos para diversas enfermidades e pela melhoria na estrutura de atendimento médico, doenças crônicas e degenerativas passaram a predominar na atualidade, em detrimento das doenças infecciosas e parasitárias. Dentre as patologias crônicas destaca-se a osteoporose, com uma importância crucial para a qualidade de vida das pessoas idosas, sendo muito estudada recentemente¹. Osteoporose é definida internacionalmente como uma doença sistêmica progressiva caracterizada por diminuída densidade óssea e microarquitetura deteriorada do esqueleto, que leva a aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas⁸. Com a supressão ovariana que ocorre na menopausa, ambas as etapas da remodelação óssea são exacerbadas, sendo a reabsorção de forma mais proeminente que a formação, gerando assim perda óssea¹⁸ e predispondo a fraturas. Nos pacientes em que a densidade óssea é questionável, o bom prognóstico de vários procedimentos odontológicos protéticos restauradores, como implantes osseointegrados, próteses totais e parciais removíveis é dificultado. Deficiências ósseas são de grande interesse, afetam os tratamentos em todos os campos da Odontologia e tornam-se um desafio para o cirurgião-dentista, principalmente nas áreas de periodontia, cirurgia bucomaxilofacial, prótese, ortodontia e implantodontia.

A descoberta de que os bisfosfonatos poderiam inibir a reabsorção óssea ocorreu após experiências, na década de sessenta, para a identificação de agentes semelhantes ao pirofosfato que pudessem também regular a calcificação óssea, sendo potencialmente úteis para a prevenção de calcificações ectópicas²³. Os bisfosfonatos são análogos ao pirofosfato, no qual a ponte de oxigênio é substituída por um átomo de carbono e modificada por cadeias laterais de comprimentos e configurações variáveis²⁵. A presença de um átomo de carbono ligando os dois grupos fosfato proporciona aos bisfosfonatos resistência à hidrólise enzimática²³. Como o pirofosfato, os bisfosfonatos têm afinidade pelos cristais de hidroxiapatita, ligando-se fortemente a eles, especialmente nos pontos de remodelamento ativo¹. O principal efeito dos bisfosfonatos farmacologicamente ativos é a inibição de reabsorção óssea¹, agindo seletivamente no tecido ósseo e interferindo na ação dos osteoclastos. Acredita-se que estes medicamentos sejam internalizados pelos osteoclastos

e interfiram com processos bioquímicos que resultam em apoptose. O exato mecanismo de ação dos bisfosfonatos ainda é objeto de estudo²⁵. Estes medicamentos são atualmente empregados para o tratamento de várias doenças caracterizadas pelo aumento da reabsorção óssea, como doença de Paget do osso, osteoporose²⁴ e mieloma múltiplo².

Alguns trabalhos têm mostrado a eficiência de bisfosfonatos administrados topicamente após o estabelecimento de situações que favorecem a reabsorção óssea. Yaffe et al.³⁴ (1997) avaliaram os efeitos da administração tópica de alendronato na reabsorção óssea após realização de retalhos totais em mandíbulas de ratos e observaram diminuição da reabsorção óssea após o uso do medicamento; resultados também encontrados por Kaynak et al.¹⁴ 2000; Tani-Ishii et al.²⁹ 2001, que induziram periodontite em ratos através da inoculação de *Porphyromonas gingivalis* e administração de dieta em pasta. Após a administração de icadronato verificaram inibição da reabsorção óssea.

Frente ao relatado, propusemo-nos a avaliar o processo de reparo ósseo, utilizando localmente um medicamento inibidor da reabsorção (alendronato sódico), em ratas com remodelação óssea aumentada devido à ovariectomia.

MATERIAL E MÉTODO

Para este trabalho foram utilizadas 28 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com aproximadamente noventa dias de idade, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente e alimentadas com ração e água *ad libitum*, fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP protocolo 005/2002-PA/CEP.

Todos os animais foram pesados em balança digital (Micronal B600-São Paulo, SP, Brasil) imediatamente antes de qualquer procedimento cirúrgico, para a quantificação correta da dosagem de anestésico e avaliação da porcentagem de ganho de peso durante o experimento. Para anestesia geral, foi utilizada mistura de 13mg/Kg de solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum- Bayer- São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa analgésica além de relaxante muscular, com

33mg/Kg de cetamina base (Francotar- Virbac- Roseira, SP, Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

No início do experimento (dia 0), metade dos animais foi submetida à ovariectomia bilateral (grupo OVX) e o restante, a cirurgia *sham* ou falsa ovariectomia, para simulação do estresse cirúrgico (grupo SHAM). Para as cirurgias, após anestesia, depilação da região abdominal lateral e antisepsia com álcool iodado, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na linha média próximo ao nível dos rins, abaixo da última costela, e o ovário foi identificado e exposto. No grupo OVX, realizou-se a hemostasia através da ligação da parte superior da trompa com fio de seda nº 4 (Ethicon- Johnson & Johnson- São José dos Campos, SP, Brasil) e excisão ovariana juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero. Suturou-se a camada muscular com fio de sutura absorvível catégute nº4 (Cirumédica- Cotia, SP, Brasil) e a pele, com fio de seda nº 4 (Ethicon- Johnson & Johnson- São José dos Campos, SP, Brasil). No grupo SHAM, após a exposição do ovário, procedeu-se à recolocação dos órgãos na cavidade abdominal e sutura.

Um mês após a ovariectomia ou cirurgia *sham* (dia trinta), todas as ratas foram anestesiadas para realização do defeito ósseo em calvárias. Após depilação da região fronto-parietal, foi realizada antisepsia com álcool iodado e incisão em forma de meia lua com bisturi nº15, no tegumento de revestimento do crânio. Em seguida, com auxílio de um destaca-periósteo, o retalho foi levantado lateralmente, expondo a superfície óssea da região. Com uma broca trefina de 8mm de diâmetro e irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, foi realizado o defeito de tamanho crítico²⁷ na região fronto-parietal, trespassando toda a espessura da díploe e expondo as meninges no fundo da lesão. A seguir a lesão foi preenchida conforme o tipo de tratamento: esponja de colágeno liofilizado de origem bovina reabsorvível (Hemostop esponja-Herix S.A., Montevideo, Uruguai) embebida durante 30 min em solução 20mg/mL de alendronato sódico (ALN) ou em solução fisiológica (NaCl 0,9%-controle). Cada animal do grupo ALN recebeu uma média de 2mg de alendronato sódico na região do defeito. O Quadro 1 ilustra a divisão dos grupos experimentais.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais

Hormônios Ovarianos	Presença(SHAM)		Ausência(OVX)	
Medicamento	Solução fisiológica	ALN	Solução fisiológica	ALN
Grupo	SHAM-controle	SHAM-ALN	OVX-controle	OVX-ALN
Nº de animais	7	7	7	7

Para o sacrifício, trinta dias após a confecção do defeito ósseo (dia sessenta), os animais foram anestesiados e decapitados em guilhotina. As calotas cranianas foram retiradas com a pele sobreposta, fixadas em solução de formalina a 10% por um período mínimo de 48 horas e descalcificadas em solução aquosa de ácido etilendinetriilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado (EDTA- Titriplex® P.A – Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de sódio P.A. (Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 4,13%.

Durante a análise macroscópica em lupa estereoscópica, as peças foram hemisseccionadas sagitalmente na região central do defeito ósseo. Cada

fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em um bloco de parafina e submetido à técnica histológica de rotina. Dez cortes semi-seriados (duas lâminas por nível) de cada bloco, com aproximadamente 5µm de espessura e 15µm entre cada nível foram corados com hematoxilina e eosina, e submetidos à análise em microscopia de luz.

A matriz óssea neoformada nos defeitos experimentais foi quantificada através de planimetria por contagem de pontos. Em cada corte, foi realizada a contagem de quatro campos histológicos: um em cada borda do defeito e dois na região central. Foram sele-

cionadas através de amostragem sistemática, quatro lâminas de cada bloco, sendo uma de cada nível. As lâminas foram analisadas por um único observador que desconhecia o grupo ao qual pertenciam. O valor de porcentagem de área de matriz óssea na região analisada, por animal, foi a média dos valores obtidos nas oito lâminas avaliadas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de porcentagem de área óssea foram submetidos à estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA) a dois fatores: medicamento (ALN ou controle) e hormônios ovarianos (OVX ou SHAM).

Para a avaliação do peso das ratas, os dados obtidos no dia trinta e sessenta foram transformados em porcentagem de ganho de peso em relação ao peso inicial (dia 0) e submetidos também à estatística descritiva e à ANOVA para medidas repetidas a três fatores (tempo: trinta ou sessenta dias; hormônios ovarianos: OVX ou SHAM; e medicamento: ALN ou SORO). Após o teste ANOVA, aplicou-se o teste de Comparação Múltipla de Tukey, quando necessário.

O nível de significância (p) adotado foi o valor de 5% para todos os testes. Para a realização das análises, foi utilizado o programa computacional STATISTIX for Windows versão 8.0 (2003 – Analytical Software-Tallahassee, FL, USA).



FIGURA 1 – Grupo SHAM-controle. Formação de tecido ósseo imaturo a partir das bordas bem definidas (→) do defeito experimental. Tecido conjuntivo fibroso no interior do defeito (*). Aumento original de 100x. HE.

RESULTADOS

Análise histológica

Histologicamente, as lâminas de todos os grupos apresentaram-se muito semelhantes, sem diferenças morfológicas entre as amostras de animais ovariectomizados ou não, nem entre aquelas de animais tratados com implante de esponja de colágeno embebida em solução de alendronato sódico ou em solução fisiológica. Portanto, serão descritas conjuntamente.

Nas bordas do defeito, que possuíam sempre as margens bem definidas, observou-se a presença de escassa formação de tecido ósseo imaturo (Figura 1) com grande quantidade de osteócitos volumosos (Figura 2 e 3), dispostos de maneira irregular, além de linhas reversas basófilas (Figura 2). Na superfície deste, osteoblastos estavam presentes (Figura 2 e 3), ora bastante volumosos, ora mais achatados e dispostos lado a lado. O periósteo mostrou-se regular, margeando o tecido ósseo formado e com grande quantidade de células osteogênicas e fibras colágenas.

Neoformação óssea foi encontrada apenas nas bordas dos defeitos (Figura 1), que apresentaram-se preenchidos por tecido conjuntivo fibroso (Figura 1, 2 e 4) com infiltrado inflamatório crônico (Figura 4) predominantemente linfocitário e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (Figura 3 e 4) contendo muitas vezes fragmentos do material implantado em seu interior. Resíduos da esponja de colágeno foram encontrados também dispersos pelo tecido conjuntivo.

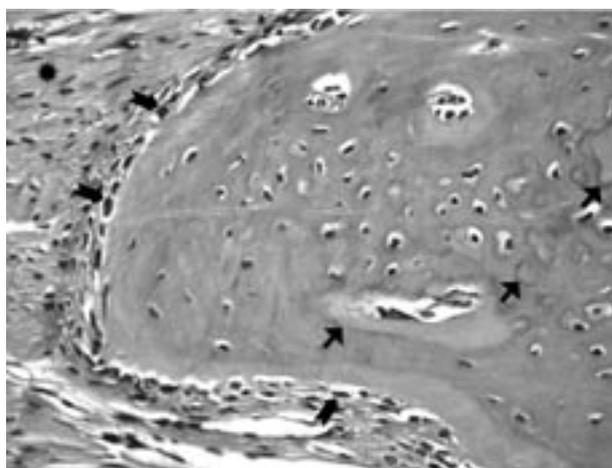


FIGURA 2 – Grupo OVX-controle. Osteoblastos circundando o tecido ósseo neoformado (↗), com osteócitos volumosos e linhas reversas (↔). Tecido conjuntivo fibroso (*). Aumento original de 400x. HE.

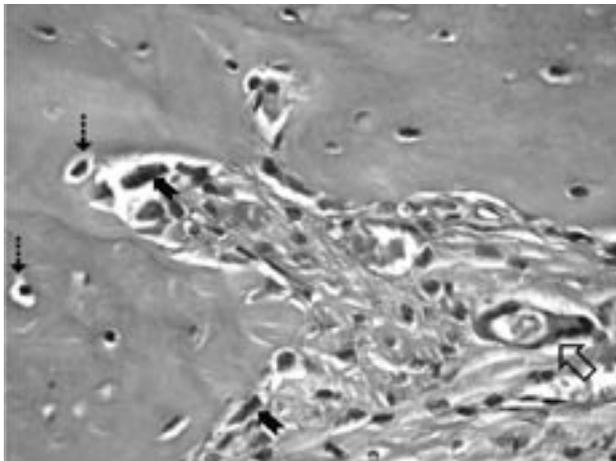


FIGURA 3 – Grupo SHAM-controle. Osteoblastos circundando o tecido ósseo neoformado (⇨), com osteócitos volumosos (⇩). Célula gigante multinucleada (⇨) contendo material fagocitado em seu citoplasma. Aumento original de 630x. HE.

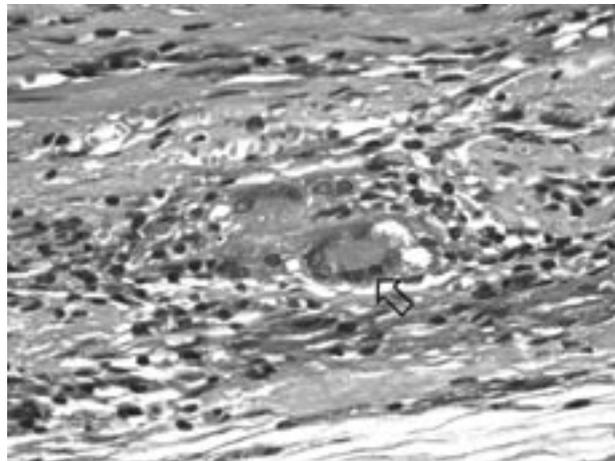


FIGURA 4 – Grupo SHAM-ALN. Célula gigante do tipo corpo estranho (⇨) contendo material fagocitado em seu citoplasma, em meio a tecido conjuntivo fibroso com infiltrado inflamatório crônico. Aumento original de 630x. HE.

Análise histomorfométrica

Foi realizada a análise histomorfométrica para quantificar o reparo ósseo. Durante o preparo histológico algumas lâminas não ficaram satisfatórias para leitura, reduzindo as amostras a seis ratos por grupo. Estão representados na Figura 5 as médias e desvios-padrão dos valores de por-

centagem de matriz óssea nos diferentes grupos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa relacionada aos fatores hormônios ovarianos (ANOVA, $F_{gl.(1;23)} = 2,53$; $p=0,1277$), medicamento (ANOVA, $F_{gl.(1;23)} = 1,40$; $p=0,2513$), nem à interação entre os dois fatores (ANOVA, $F_{gl.(1;23)} = 0,02$; $p=0,8821$).

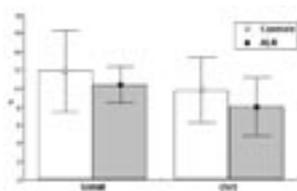


FIGURA 5 – Gráfico de colunas representando médias e desvios-padrão referentes à interação entre os fatores medicamento e hormônios ovarianos, para os dados de porcentagem de matriz óssea

ANÁLISE DO GANHO DE PESO

Os dados da estatística descritiva dos valores de porcentagem de ganho de peso no dia trinta (dia da

confeção do defeito ósseo) e sessenta (dia do sacrifício), a partir do dia da ovariectomia ou cirurgia *sham* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Estatística descritiva referente aos dados dos valores da porcentagem de ganho de peso

Grupo	Dia	Média(%)	DP(%)	Max.(%)	Min.(%)
SHAM	30	03,18	04,06	07,43	-3,49
ALN	60	12,01	04,68	17,53	5,29
SHAM	30	04,60	04,08	10,80	0
controle	60	14,54	04,29	21,51	10,43
OVX	30	06,70	03,78	10,98	-1,10
ALN	60	17,97	03,25	21,59	13,45
OVX	30	05,71	02,42	08,48	1,20
controle	60	19,57	05,01	29,84	13,90

DP: desvio-padrão
Máx.:valor máximo
Mín.:valor mínimo

Após a realização da estatística inferencial, verificou-se que as ratas OVX ($12,49 \pm 7,33\%$) ganharam, de maneira estatisticamente significativa, mais peso que as SHAM ($8,58 \pm 6,34\%$) (ANOVA, $F_{gl(1;55)} = 7,34$; $p=0,012$). Da mesma maneira que a ovariectomia, o tempo influenciou positivamente o ganho de peso, sendo que as ratas ganharam mais peso do dia 0 até o dia 60 ($16,02 \pm 5,08\%$) do que até o dia 30 ($5,05 \pm 3,69\%$) (ANOVA, $F_{gl(1;55)} = 514,81$; $p=0,001$). O fator medicamento não causou influência estatística-

mente significativa sobre o peso dos animais (ANOVA, $F_{gl(1;55)} = 0,62$; $p=0,438$). A interação entre os fatores hormônios ovarianos e tempo foi a única que resultou significativa (ANOVA, $F_{gl(1;55)} = 10,82$; $p=0,003$).

Na Figura 6, as médias e desvios-padrão referentes à interação significativa podem ser observados. Após o teste de comparação múltipla de Tukey, verificou-se que a diferença entre os pesos dos animais sham e ovariectomizados tornou-se efetivamente significativa dois meses após a cirurgia abdominal.

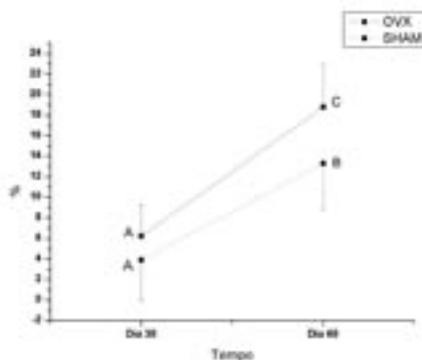


FIGURA 6 – Médias e desvios-padrão referentes à interação entre os fatores tempo e hormônios ovarianos, para os dados de porcentagem de ganho de peso. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

Saville²⁶ (1969) foi um dos primeiros autores a observar uma diminuição na densidade óssea em animais castrados. Após a medida da densidade óssea dos fêmures de ratos machos e fêmeas, castrados aos 21 dias e sacrificados em intervalos de duas semanas, o autor verificou neste grupo menores valores que no grupo controle, de animais não castrados. Desde então, o modelo de osteopenia induzida pela ovariectomia em ratas tem sido amplamente utilizado em pesquisas e é muito útil para o estudo de problemas relacionados à perda óssea após menopausa em humanos. Entre as características comuns ao modelo experimental e a perda óssea que ocorre após a menopausa estão: aumento da taxa de remodelação óssea, com mais reabsorção que formação óssea; perda óssea inicial rápida, seguida por uma fase mais lenta; maior perda de osso esponjoso que cortical e respostas esqueléticas similares a terapias com estrógenos, bisfosfonatos, paratormônio, calcitonina e exercícios¹².

Os efeitos da deficiência gonadal no tecido ósseo esponjoso são bem documentados em várias espécies, principalmente em ratos, mas seus efeitos no tecido ósseo cortical são menos claros³¹. Pytlík et al.²² (2003) observaram aumento da reabsorção tanto no osso cortical como no osso esponjoso, em ossos longos, um mês após a ovariectomia em ratas. Junqueira et al.¹¹ (2002) analisaram o reparo de defeitos ósseos em mandíbulas de ratas sessenta e noventa dias após ovariectomia, e verificaram menor formação de tecido ósseo nos animais com ausência de hormônios ovarianos. No entanto, em nosso experimento não foram encontradas diferenças no tecido ósseo preexistente nem na reparação do defeito ósseo na calota entre os animais SHAM e OVX. Tal achado pode estar relacionado ao reparo e remodelação mais lenta que ocorrem na maxila e no crânio, quando comparados com tibia e mandíbula¹⁹ e ao fato da ovariectomia causar maior perda de tecido ósseo esponjoso que cortical¹². Para a avaliação dos efeitos da osteopenia causada pela remoção ovariana em calota de ratos, talvez um período maior que sessenta dias após a ovariectomia fosse necessário.

O reparo de defeitos ósseos é um modelo que tem sido utilizado em muitos experimentos clássicos que analisam a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea. Um defeito ósseo experimental deve ser tão grande que não ocorra reparo espontâneo, pois só nesta situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medica-

mento pode ser considerado real. O defeito intra-ósseo de tamanho crítico seria aquele de menor tamanho que não pode ser reparado espontaneamente durante toda a vida do animal²⁷. Segundo o protocolo sugerido por Schmitz & Hollinger²⁷ (1986) para avaliação de novos materiais para reparo ósseo na região maxilofacial, os testes em animais devem iniciar-se pelo modelo de defeito ósseo de 8mm em calvária de ratos.

Vários trabalhos têm mostrado a eficiência de bisfosfonatos administrados topicamente após o estabelecimento de situações que favorecem a reabsorção óssea. A administração tópica de alendronato diminuiu a reabsorção óssea causada pela realização de retalhos mucoperiosteais em mandíbulas de ratos^{14,34}, sendo que 10% do conteúdo total de alendronato aplicado no local da cirurgia foi absorvido pelo tecido ósseo³³. Após implante de alendronato na submucosa da bochecha no lado oposto ao retalho mucoperiosteal também foi observada diminuição da reabsorção óssea³. Em nosso trabalho, entretanto, não encontramos diferença estatisticamente significativa na reparação óssea entre os grupos que receberam ou não tratamento com alendronato. Para explicar o fato, pode-se levantar a hipótese da ineficiência da dose utilizada e/ou ineficiência da esponja de colágeno como carreador para o medicamento, no período em questão. Matura¹⁷ (2003) avaliou a ação do gel de alendronato (15mg/mL) em defeitos periodontais infra-ósseos em humanos e verificou redução da profundidade clínica de sondagem em menor grau que no grupo controle e perda clínica de inserção, além de ausência de diferença significativa entre os grupos com relação a reabsorção do osso alveolar do fundo do defeito. Segundo a autora, o alendronato pode ter afetado negativamente a reparação dos tecidos periodontais.

Utilizou-se a esponja de colágeno como carreador para a solução de alendronato porque o colágeno é um material biocompatível e seguro devido a suas características biológicas como biodegradabilidade e fraca antigenicidade, muito utilizado como carreador de medicamentos¹⁵. Possui ainda um efeito hemostático, levando à hemostasia instantânea quando implantado em defeitos ósseos³². Okamoto et al.²⁰ (1993) estudaram o processo de reparo de feridas de extração após implante de colágeno esponjoso em ratos e verificaram que tal material ocasiona reação inflamatória nos primeiros dias e é reabsorvido rapidamente pelo organismo, sendo que pequena quantidade do material pôde ser observada nos alvéolos dos animais sacrificados dez dias após a exodontia, e naqueles sacrificados após 21 dias, não eram encontrados mais vestígios do

material no alvéolo. Wong & Rabie³² (2003) avaliaram os efeitos de implantes de colágeno embebidos em solução de sinvastatina em defeitos ósseos em calvária de coelhos e verificam, após 14 dias, osteoindução nos animais que receberam o medicamento e naqueles em que o defeito recebeu apenas esponja de colágeno embebida em água, verificou-se escassa formação óssea nas bordas do defeito e fibras colágenas no centro do defeito, assemelhando-se aos nossos resultados, além de significativa presença da esponja de colágeno implantada. Os resultados relativos a pouca formação óssea e preenchimento do defeito por tecido conjuntivo fibroso encontrados em nosso trabalho assemelham-se também ao observado nos grupos controle, nos quais nenhum material de implante ou membrana foi utilizado para estimular o reparo de defeitos de 7 a 8mm em calvária de ratos, dos estudos de Lim et al.¹⁶ (2000) e Kamakura et al.¹³ (2001). Tais achados levam a crer que o colágeno implantado não foi eficiente como arcabouço para a substituição do osso, podendo ter sido rapidamente reabsorvido, frustrando o isolamento do defeito e permitindo seu preenchimento por tecido conjuntivo fibroso, como acontece nos defeitos sem preenchimento.

Mulheres na menopausa, desprovidas dos efeitos dos estrógenos, além de fatores ambientais negativos, como o sedentarismo, têm maior tendência ao ganho de peso, especialmente na região abdominal⁶. O aumento de gordura em mulheres pós menopáusicas pode estar relacionado à redução do gasto energético durante o repouso e redução de atividades físicas desses indivíduos, levando a um balanço energético positivo²¹. A literatura tem mostrado que a remoção de estrógeno está relacionada a aumento da ingestão de alimentos e aumento de peso em roedores^{5,10,35}. Segundo Chen⁶ & Heiman⁵ (2001), o aumento de peso decorrente da hiperfagia causada pela ovariectomia ocorre tanto na

massa magra, quanto no tecido gorduroso dos animais. Assim, o sucesso da ovariectomia em reduzir os níveis de hormônios ovarianos em nosso trabalho pode ser avaliado através das alterações de peso corporal dos animais, apesar de não termos encontrado diferenças com relação à neoformação óssea nos animais OVX e SHAM. São raros os trabalhos que relatam que a ovariectomia, apesar de induzir aumento de peso, não aumenta o consumo de alimentos³⁰.

Os mecanismos pelos quais a ausência de hormônios ovarianos leva à hiperfagia estão sendo bastante estudados e várias hipóteses têm sido levantadas. Tem-se discutido a ação da leptina, um hormônio secretado principalmente pelo tecido gorduroso, que regula a ingestão alimentar, e sua relação com a homeostase energética e os estrógenos. Alguns autores acreditam que o estrógeno regula a produção de leptina em ratos e em humanos²⁸. Um estímulo ao aumento na atividade da via de sinalização da saciedade pelo glucagon pode ser parte do mecanismo dos efeitos inibitórios do estradiol na alimentação⁹. O estradiol ainda aumenta o efeito de saciedade causado pelo peptídeo intestinal colecistocinina e o núcleo paraventricular do hipotálamo é um dos locais do sistema nervoso envolvido na interação entre o peptídeo e o hormônio esteróide⁴. No núcleo do trato solitário, um dos responsáveis pelo controle nervoso da ingestão alimentar, além do núcleo paraventricular e no núcleo central da amígdala, o estradiol aumenta a atividade neuronal induzida pela alimentação⁷.

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais utilizadas, pôde-se concluir que a ovariectomia e/ou aplicação tópica de alendronato sódico não influenciaram o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calota de ratas.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the influence of local delivery of alendronate sodium on the regeneration of calvarial defects in ovariectomized rats. Twenty-four-three-month-old female rats were ovariectomized or sham operated. After one month, an 8mm calvarial defect was created and grafted with alendronate sodium dissolved in physiological solution (20mg/mL) mixed with absorbable collagen sponge or physiological solution mixed with sponge alone (control). Body weight was assessed immediately before the ovariectomy (or sham), the bone defect creation and the sacrifice, which was carried out thirty days after the calvarial defect was created. Then, decalcification, routine laboratorial processing, histological and histomorphometrical analyses were carried out. For statistical evaluation, ANOVA test was used ($\alpha=0.05$). There was no significant difference in bone regeneration among groups. Histologically, all animals were similar, with little bone at the ends of the host bone and a fibrous tissue bridging across the defect. Ovariectomized rats had increased rate of weight gain. It was concluded, under the conditions of this experiment, that ovariectomy and/or locally delivered alendronate sodium did not influence bone regeneration of critical size calvarial defects, and that neutering and longer observation period were related to body weight gain in rats.

UNITERMS

Alendronate; diphosphonates; bone regeneration; ovariectomy; skull, animal; analysis of variance.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/PIBIC pela concessão de auxílio financeiro e à empresa A.S. Technology, pelo fornecimento das brocas utilizadas.

REFERÊNCIAS

1. Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. 390p. Cap 3, p.31-49;Cap 22, p.351-72.
2. Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA, Anderson K, Lipton A, Yee GC et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. J Clin Oncol. 2002 Sept.; 20 (17): 3719-33.
3. Binderman I, Adut M.; Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. J Periodontol. 2000 Aug.; 71(8):1236-40.
4. Butera PC, Ming X, Davis RJ, Platania SP. Central implants of dilute estradiol enhance the satiety effect of CCK-8. Behav Neurosci. 1996 Aug.; 110 (4): 823-30.
5. Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 Feb.; 280 (2): E315-22.
6. Dubnov G, Brzezinski A, Berry EM. Weight control and management of obesity after menopause: the role of physical activity. Maturitas. 2003 Feb.; 44 (2):89-101.
7. Eckel LA, Geary N. Estradiol treatment increases feeding-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 Sept.; 281 (3):R738-46.
8. Genant HK, Cooper C, Poor R, Reid I, Ehelich G, Kanis J et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. Osteoporos Int. 1999; 10 (4):259-64.
9. Gery N, Asarian L. Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. Am J Regul Integr Comp Physiol. 2001 Oct.; 281(4):1290-94.
10. Ima-Nirwana S, Norazlina M, Top AGMD, Khalid BAK. Vitamin E deficiency impairs weight gain in normal and ovariectomised growing female rats. Med J Islamic Acad Sci [periódico na internet]. 1998 [citado em 03 Aug. 2004], 11 (3). Disponível em : http://www.medicaljournal-ias.org/11_3/Nirwana.htm.
11. Junqueira JC, Mancini MNG, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized and on blood cholesterol level. J Oral Sci. 2002 Dec.; 44 (3-4): 117-24.
12. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner. 1991 Dec.; 15 (3): 175-92.
13. Kamakura S, Sasano Y, Homma H, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K. Implantation of octacalcium phosphate nucleates isolated bone formation in rat skull defects. Oral Dis. 2001 Jul.; 7(4):259-65.
14. Kaynak D, Meffert R, Gunhan M, Gunhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on the resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. J Periodontol. 2000 May; 71(5):790-6.

15. Lee C H, Singla A, Lee H. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharmaceutics*. 2001 Jun.; 221(1-2): 1-22.
16. Lim SC, Lee MJ, Yeo HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol Int*. 2000 Aug.; 50 (8): 594-602.
17. Matsura E. Análise clínica do efeitos do gel de alendronato de sódio na reparação de defeitos infra-ósseos periodontais, em humanos. [dissertação] São Paulo: Faculdade de Odontologia; Universidade de São Paulo; 2003.
18. Modesto Filho J, Azevedo LAP, Azevedo LCP. Tratamento da osteoporose. *J Bras Méd*. 1996 nov./dez.; 71(5/6):77-9.
19. Najjar T, Kahn D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. *J Oral Surg*. 1977 May; 35(5):375-9.
20. Okamoto T, Hayacibara RM, Sato MT, Filho WDN. Processo de reparo em feridas de extração dental após implante de colágeno esponjoso-estudo histomorfológico. *Rev Paul Odontol*. 1993 set./out.; 15(5): 26-36.
21. Poehlman TE. Menopause, energy expenditure, and body composition. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002 July; 81(7): 603-11.
22. Pytlik M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, Gubala I. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol*. 2003 Jan./Feb.; 55(1):63-71.
23. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monk-konen J et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 1999 May.; 24 (suppl-5):73S-9S.
24. Rosen CR, Kessenich C. Comparative clinical pharmacology and therapeutic use of bisphosphonates in metabolic bone disease. *Drugs*. 1996 Apr.; 51(4):537-51.
25. Russel R, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res*. 1999 Oct.; 14 (suppl-2): 53-65.
26. Saville PD. Changes in skeletal mass and fragility whit castration in the rat: a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc* 1969; 17 (2): 155-66.
27. Schmitz JP, Holinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop*. 1986 Apr.; (205):298-307.
28. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, N Sato et al. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol*. 1997 Aug.; 154 (2):285-92.
29. Tani-Ishii N, Saitoh D, Minamida G, Omuro H, Sugaya A, Hamada N et al. Inhibitory effect of incadronate for bone resorption induced by P. gingivalis. [abstract] *J Dent Res* 2001 Jan.; 80: 221.
30. Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr*. 2001 Sept.; 131(9):2351-7.
31. Wilson AK, Bhattacharyya MH, Miller S, Mani A, Sacco-Gibson N. Ovariectomy-Induced changes in aged beagles: histomorphometry of rib cortical bone. *Calcif Tissue Int*. 1998 Mar.; 62 (3): 237-43.
32. Wong RWK, Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Aug.; 41 (4): 244-8.
33. Yaffe A, Binderman I, Breuer E, Pinto T, Golomb G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. *J Periodontol*. 1999 Aug.; 70 (8): 893-5.
34. Yaffe A, Iztzkovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol*. 1997 Sept.; 68(9): 884-9.
35. Yoneda N, Saito S, Kimura M, Yamada M, Iida M, Murakani T et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm Metab Res*. 1998 May; 30(5): 236-5.

Recebido em: 19/08/04

Aprovado em: 08/12/04

Rosilene Fernandes da Rocha
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP
Av. Francisco José Longo, 777 – São Dimas
CEP: 12245-000 – São José dos Campos – SP
rosilene@fosjc.unesp.br