



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA**

**EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS  
NA DIÁFISE DOS FÊMURES DE RATOS OSTEOPORÓTICOS TRATADOS  
COM OSTEOSSÍNTESE INTRAMEDULAR**

**FORTALEZA**

**2018**

**SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA**

**EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS  
NA DIÁFISE DOS FÊMURES DE RATOS OSTEOPORÓTICOS TRATADOS  
COM OSTEOSSÍNTESE INTRAMEDULAR**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de Concentração: Metabolismo, fisiologia e biologia celular no estresse.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

**FORTALEZA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R576e Rocha, Sânia Nara Costa da.  
Efeitos do ácido zoledrônico na consolidação de fraturas na diáfise dos fêmures de ratos osteoporóticos tratados com osteossíntese intramedular. / Sânia Nara Costa da Rocha. – 2018.  
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite..
1. Osteoporose. . 2. Fraturas do fêmur. . 3. Ratos.. I. Título.

CDD 617

---

SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA

EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS  
NA DIÁFISE DOS FÊMURES DE RATOS OSTEOPORÓTICOS TRATADOS  
COM OSTEOSSÍNTESE INTRAMEDULAR

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia,  
como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em  
Cirurgia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho desta é permitida, desde que seja de  
conformidade com as normas de ética científica.

Data de aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. José Lima de Carvalho Rocha  
Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS

Prof. Dr. José Atualpa Pinheiro Junior  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Ramile Araujo Lima  
Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS

Profa. Dra. Vilma Leite de Sousa Pires Albuquerque  
Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS

A Deus por me guiar num caminho de amor e por me proporcionar nessa existência tantos momentos abençoados.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Lusmar Veras Rodrigues, coordenador do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e ao professor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, vice-coordenador do programa.

Ao meu orientador Professor Doutor José Alberto Dias Leite, por ter acreditado em mim. Por ter aberto as primeiras portas para seguir a carreira acadêmica. Pela sua dedicação, auxílio e otimismo.

Ao meu grande mestre Professor Doutor José Lima de Carvalho Rocha, Reitor do Centro Universitario Christus, pelo exemplo de ser humano e profissional. Por acreditar e confiar em mim, apresentar-me o mundo acadêmico e me transmitir ensinamentos valiosos que sempre estarão presentes em minha vida. Serei eternamente grata por tudo. Por ter aceitado participar da Banca de Qualificação e de Defesa desse trabalho.

Aos reitores do Centro Universitario Christus, José Lima de Carvalho Rocha e Estevão Lima de Carvalho Rocha, por terem disponibilizado todos os recursos da Instituição para o sucesso desta pesquisa. A infraestrutura encontrada na Instituição foi de extrema importância para a realização do presente trabalho

Ao professor Mestre Mac Gayver da Silva Castro por desenvolver um *software* para esta pesquisa e, conseqüentemente, proporcionar contribuição primordial nas análises das imagens radiográficas. Pela sua capacidade intelectual, competência e seriedade, características que fizeram o diferencial na análise dos dados.

À Coordenadora Geral dos laboratórios do Centro Universitário Christus - Unichristus, Professora Doutora Anne Carolinne Perdigão, por sempre ser tão solícita e atenciosa comigo. Pelas inúmeras vezes em que ela me auxiliou para que eu obtivesse êxito na pesquisa. Pelo incentivo e carinho.

Ao Professor Doutor George Candeiro, por permitir a utilização de sua clínica para obtenção e digitalização das imagens radiográficas.

Ao professor Doutor Paulo Goberlânio, por ter preparado, com tanto esmero, as lâminas histológicas utilizadas nesse estudo. Por orientar sobre o uso do programa para análise histológica. Pela sua contribuição essencial nos resultados deste trabalho.

Aos Professores Doutores Luciano Pamplona Goes Cavalcanti, José Lima de Carvalho Rocha, José Atualpa Pinheiro Junior, Ramille Araújo Lima e Vilma Leite de Sousa Pires Albuquerque por suas participações e contribuições na Banca Examinadora deste trabalho.

À coordenadora do Biotério do Centro Universitário Christus, Daniele Barbosa, por ceder os animais para a pesquisa. Pela sua atenção e vontade de ajudar sempre.

Às senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós- Graduação *Strictu Sensu* do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por terem sempre tanto zelo com cada um dos alunos, mostrando-se sempre competentes e dispostas a ajudar. Obrigada pelo carinho.

Aos funcionários do Centro Universitario Christus, Mayara, Emanuel, Gonzaga, Dedé Silva, Daniel e Cecília pela disponibilidade, paciência e vontade de contribuírem para o sucesso da pesquisa.

Aos acadêmicos de Medicina Amanda, Augusto, Paulo Mateus e Marcela pelo interesse e ajuda dada a esta pesquisa.

À professora Dilene Rodrigues pelo apoio e carinho. Sua amizade é preciosa e rara.

À minha mãe, Vânia Costa, pelo seu exemplo diário de fé, determinação, coragem, amor, cuidado, generosidade e garra. Pela sua capacidade de fazer tudo acontecer e colocar seu amor e energia em tudo o que faz. Por sempre acreditar em mim, me motivar a realizar meus sonhos e me compreender tão bem. Por amar minha filha incondicionalmente. Por todo o suporte dado para que eu consiga fazer o meu papel de mãe e dar conta de todos os outros âmbitos de minha vida.

À minha filha infinitamente amada, Liz Costa Leite, pela luz que trouxe aos meus dias. Por ser tão pequenina, mas ser exatamente como sonhei, temente a Deus, correta, amorosa e carinhosa. Por ser a minha maior professora, pois me ensina a renunciar sem perder absolutamente nada e ser absurdamente feliz. Pelo aprendizado constante do que é o amor e cuidado incondicional.

Às minhas irmãs, Mara e Dânia Costa, por serem minhas grandes amigas, por andarem lado a lado comigo nessa jornada. Pela paciência, amor e dedicação.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fazem parte da minha vida e que contribuíram para a realização deste desafio. Obrigada por existirem.

**Assim diz o SENHOR:**

“Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força; não se glorie o rico nas suas riquezas, mas o que se gloriar glorie-se nisto: em me entender e me conhecer que eu sou o SENHOR, que faço beneficência, juízo e justiça na terra; porque dessas coisas me agrado, diz o Senhor”.

(Jeremias 9:23-24).

## RESUMO

ROCHA, Sânia Nara Costa da. **Efeitos do ácido zoledrônico na consolidação de fraturas na diáfise dos fêmures de ratos osteoporóticos tratados com osteossíntese intramedular**. 2018. 102f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

Com a inversão da pirâmide populacional houve um aumento da incidência das doenças que cursam com o envelhecimento, notadamente a osteoporose. É uma doença caracterizada por redução da resistência óssea, aumentando a suscetibilidade do indivíduo para a ocorrência de fraturas. As quedas em idosos com osteoporose conduzem, frequentemente, a uma redução da qualidade de vida, perda da independência, hospitalização, perda das capacidades funcionais e acarretam grande impacto econômico. O tratamento deve ter por base a fisiopatologia da doença, devendo haver diminuição da atividade do osteoclasto e/ou aumento da atividade dos osteoblastos. Estudos clínicos demonstraram que o uso de bisfosfonatos reduz o risco de fraturas femorais em pacientes osteoporóticos. O bisfosfonato eleito para estudo no presente trabalho foi o ácido zoledrônico (AZ). O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do AZ na consolidação de fratura diafisária de fêmures de ratos osteoporóticos submetidos à osteossíntese intramedular. A amostra foi composta por 36 ratos machos, adultos, da linhagem wistar, com peso que variou de 250 a 300g. Os animais foram divididos em dois grupos: controle AZ. E foram subdivididos em três grupos, de acordo com o período de consolidação óssea (7, 14 e 28 dias). Em todos os animais, foi administrada hidrocortisona por um período de 28 dias com a finalidade de induzir a osteoporose. Após esse período, em todos os grupos, foi realizada a produção de fratura na diáfise femoral e osteossíntese intramedular. O grupo do AZ recebeu, por via intraperitoneal, 0,1 mg/kg do ácido e o grupo controle recebeu solução salina. Foram realizados estudos radiológicos e histológicos. No estudo radiológico, foi quantificada a área do calo ósseo. O estudo histológico foi realizado para quantificar a formação de colágeno tipo I e tipo III na região cortical próxima à fratura e no calo ósseo. No que se refere à área do calo ósseo, na análise intergrupos, foram constatadas diferenças estatisticamente significantes no grupo tratado com AZ. O grupo de 7 dias tratado com AZ foi significativamente inferior ao grupo controle ( $p=0,035$ ), sem diferença significativa entre esses dois grupos nos dias 14 ( $p=0,398$ ) e 28 ( $p=0,711$ ). Assim como, foram observadas, nas comparações dentro do mesmo grupo, diferença estatisticamente significativa, tanto no grupo controle ( $p=0,020$ ) como o grupo AZ ( $p=0,037$ ) apresentaram aumento estatisticamente significativo do volume do calo ósseo do dia 7 para o dia 28. Em relação ao colágeno tipo III, houve redução desse tipo de colágeno no grupo AZ (análise intergrupos). Na análise do colágeno tipo I, não houve resultado estatisticamente significativo.

**Palavras-chave:** Osteoporose. Fraturas do fêmur. Rato.

## ABSTRACT

ROCHA, Sânia Nara Costa da. **Effects of zoledronic acid in the consolidation of fractures in the femur of osteoporotic rats treated with intramedullary osteosynthesis.** 2018. 107f. Thesis (Doctorate in Medical-Surgical Sciences) - Pos-Graduation Program Stricto Sensu in Surgery, Federal University of Ceará, Fortaleza, 2018.

With the inversion of the population pyramid there was an increase in the incidence of diseases that occur with aging, especially osteoporosis. It is a disease characterized by a reduction of bone resistance, increasing the susceptibility of the individual to the occurrence of fractures. Falls in the elderly with osteoporosis often lead to reduced quality of life, loss of independence, hospitalization, loss of functional abilities and have a great economic impact. Treatment should be based on the pathophysiology of the disease, and there should be decreased osteoclast activity and / or increased osteoblast activity. Clinical studies have shown that the use of bisphosphonates reduces the risk of femoral fractures in osteoporotic patients. The bisphosphonate chosen for study in the present study was zoledronic acid (AZ). The present study had as objective to verify the effects of AZ in the consolidation of diaphyseal fracture of femurs of osteoporotic rats submitted to intramedullary osteosynthesis. The sample consisted of 36 adult male wistar rats weighing 250-300g. The animals were divided into two groups: control and AZ. E were subdivided into three groups, according to the period of bone consolidation (7,14 and 28 days). In all animals, hydrocortisone was administered for a period of 28 days for the purpose of inducing osteoporosis. After this period, the production of femoral shaft fracture and intramedullary osteosynthesis were performed in all groups. The AZ group received 0.1 mg / kg of the acid intraperitoneally and the control group received saline. Radiological and histological studies were performed. In the radiological study, the area of the bone callus was quantified. The histological study was carried out to quantify the formation of collagen type I and type III in the cortical region close to the fracture and in the bone callus. Regarding the area of bone callus, in the intergroup analysis, statistically significant differences were observed in the group treated with AZ. The 7-day group treated with AZ was significantly lower than the control group ( $p = 0.035$ ), with no significant difference between these two groups on days 14 ( $p = 0.398$ ) and 28 ( $p = 0.711$ ). As in the comparisons within the same group, a statistically significant difference was observed in both the control group ( $p = 0.020$ ) and the AZ group ( $p = 0.037$ ), showing a statistically significant increase in bone call volume from day 7 to day 28. Zoledronic acid promoted a slight increase in bone callus in the 28-day group of AZ (intragroups). Regarding the percentage of collagen type III, there was a reduction of this type of collagen in the AZ group (intergroups). In the percentage of collagen type I there was no statistically significant result.

**Keywords:** Osteoporosis. Femoral Fractures. Rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspecto dos tipos celulares envolvidos na remodelação óssea.....	28
Figura 2 -	Ilustração da localização dos tecidos que compõem o osso longo.....	30
Figura 3 -	Estrutura do ácido zoledrônico.....	38
Figura 4 -	Distribuição dos animais nos grupos acima descritos e os subgrupos com os correspondentes tempos de coleta.....	46
Figura 5 -	Incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito (JD) do animal e orifício de acesso ao canal medular entre os côndilos.....	50
Figura 6 -	Bloqueio do fio de Kirshner (F) na região trocanteriana (RT). Animal em decúbito lateral. Letras C e P correspondem, respectivamente, a coxa e pata do animal..	
Figura 7 -	Ilustração da guilhotina romba.....	51
Figura 8 -	Posicionamento do animal na guilhotina romba no momento da fratura.....	52
Figura 9 -	Posicionamento vertical do tubo numa distância de 15 cm do sensor.....	52
Figura 10 -	Controle do equipamento de Raio X demonstrando o tempo de 0,32 segundos utilizado para aquisição da imagem.....	54
Figura 11 -	Imagem radiológica capturada e digitalizada no <i>software</i> Micro Imagem©.....	54
Figura 12 -	Imagens radiográficas digitalizadas nos grupos, controle e ácido zoledrônico, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.....	56
Figura 13 -	Leitura da imagem digital.....	57
Figura 14 -	Contorno à mão livre da região que contém o calo ósseo...	58
Figura 15 -	Binarização da região do calo ósseo.....	59
Figura 16 -	Janela mostra as informações de saída do programa desenvolvido para o cálculo da área do calo ósseo.....	60

Figura 17 -	Imagens histológicas, ilustrando a diferença da densidade do colágeno tipo I e tipo III entre os grupos controle e ácido zoledrônico nos tempos estudados, 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.....	62
Figura 18 -	Ilustração do programa utilizado para quantificar a percentagem de colágeno tipo I e III, em lâminas com aumento de 100%.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores da média e erro-padrão da média do volume do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	65
Tabela 2 -	Valores da média e erro-padrão da densidade de colágeno tipo I:III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	66
Tabela 3 -	Valores da média e erro-padrão da densidade do colágeno tipo I na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	67
Tabela 4 -	Valores da média e erro-padrão do colágeno tipo III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Volume do calo ósseo mensurado nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. \* $p < 0,05$  versus D7 do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis) (Média  $\pm$  EPM)..... 64
- Gráfico 2 - Expressa a relação do colágeno tipo I:III, mensurado na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. \* $p < 0,05$  versus D7 do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis) (Média $\pm$ EPM)..... 66
- Gráfico 3 - Expressa a densidade do colágeno tipo I, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. \* $p < 0,05$  versus D7 do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis) (Média $\pm$ EPM)..... 67
- Gráfico 4 - Expressa a densidade do colágeno tipo III, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. (Teste de Kruskal-Wallis) (Média $\pm$ EPM)..... 68

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Definição da Osteoporose pela OMS baseada em	22
	Valores da Densitometria óssea (DMO).....	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF -	Alfacalcidol
ALP -	Fosfatase Alcalina
AZ -	Ácido Zoledrônico
BFs -	Bifosfonatos
BMD -	<i>Bone Mineral Density</i>
BMPs -	Proteína Morfogenética Óssea
BRONJ -	<i>Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw</i>
CBO -	Consenso Brasileiro de Osteoporose
CE -	Ceará
CEUA -	Comissão de Ética de Uso Animal
CONCEA -	Conselho Nacional de Cont. de Experimentação Animal
DICOM -	<i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>
DMO -	Densidade Mineral Óssea
DOR -	Densidade Óptica Radiográfica
DP -	Desvios Padrão
FDA -	<i>Food in Drugs Administracion</i>
FGF -	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
FOV -	<i>Field of View</i>
FPPS -	Farnesi Difosfatosintase
FRAX -	Ferramenta de Avaliação de Risco de Fratura
GAZ -	Grupo do Ácido Zoledrônico
GAZO -	Grupo do Ácido Zoledrônico com Osteossíntese
GC -	Grupo Controle
GFR -	Filtração Glomerular
IBGE -	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IL -	Interleucina
iNOS -	Óxido-Nítrico Sintase
IPTD -	Imobilização da Pata Traseira Direita
JD -	Joelho Direito
LABCEX -	Laboratório de Cirurgia Experimental
MicroTC -	Microtomografia Computadorizada

MRONJ -	<i>Medication Related Osteonecrosis of the Jaw</i>
NEXO -	Núcleo de Excelência em Odontologia
NF-kB -	Fator Nuclear kappa B
OMS -	Organização Mundial da Saúde
P-C-P -	Átomo de Carbono Central
PRO -	Propranolol
ROI -	<i>Region of Interest</i>
RT -	Região Trocanteriana
TGF- $\beta$ 1 -	Fator de crescimento transformador Beta 1
TNF -	Fator de Necrose Tumoral
UFC -	Universidade Federal do Ceará
UNICHRISTUS -	Centro Universitário Christus
VEGF -	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
ZOL -	Ácido Zoledrônico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>Envelhecimento da população brasileira.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>Osteoporose.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3</b>	<b>Hidrocortisona e sua relação com osteoporose.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	<b>Tecido ósseo.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5</b>	<b>Fratura do fêmur e consolidação óssea.....</b>	<b>31</b>
<b>1.6</b>	<b>Ácido zoledrônico.....</b>	<b>35</b>
<b>1.7</b>	<b>Importância e justificativa.....</b>	<b>41</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Local da pesquisan.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Caracterização da amostra.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Ambiente de experimentação.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Delineamento do estudo.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5.1</b>	<i>Distribuição e organização dos grupos do estudo.....</i>	<b>46</b>
<b>3.5.2</b>	<i>Técnica anestésica.....</i>	<b>47</b>
<b>3.5.3</b>	<i>Procedimento de preparação e administração das drogas.....</i>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b>Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>49</b>
<b>3.7</b>	<b>Técnica de indução da fratura.....</b>	<b>51</b>
<b>3.8</b>	<b>Estudo radiológico.....</b>	<b>53</b>
<b>3.9</b>	<b>Estudo histológico.....</b>	<b>60</b>
<b>3.9.1</b>	<i>Análise digital e determinação do percentual de marcação.....</i>	<b>61</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Estudo radiográfico.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Estudo histológico: colágeno tipo I:III no calo ósseo.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>Estudo histológico: colágeno tipo I no calo ósseo.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Estudo histológico: colágeno tipo III no calo ósseo.....</b>	<b>68</b>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....</b>	<b>103</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Envelhecimento da população brasileira

No Brasil, as estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que a população está envelhecendo (KÜCHEMANN, 2012).

Miranda, Mendes e Silva (2016, p.507), em seu estudo sobre os desafios e consequências do envelhecimento populacional brasileiro, observaram, que “em 2010, existiam 39 idosos para cada grupo de 100 jovens e em 2040, estima-se 153 idosos para cada 100 jovens.”

Desde os anos 1940, é entre a população idosa que se têm observado as taxas mais altas de crescimento populacional. Na década de 50, a taxa de crescimento da população idosa atingiu valores superiores a 3% ao ano, chegando a 3,4%, entre 1991 e 2000. Espera-se que o contingente de idosos atinja a magnitude de aproximadamente 30,9 milhões de pessoas, no ano de 2020, vindo a constituir 14% da população brasileira, ocupando, então, o sexto lugar na classificação mundial. Essa alta taxa de crescimento fez com que, na virada do século, a população brasileira de idosos apresentasse um crescimento oito vezes maior quando comparada às taxas de crescimento da população jovem (BELTRÃO; CAMARANO; KANSO, 2004; INOUE; PEDRAZZANI; PAVARINI, 2008).

A partir do ano de 1970, foi observado, no Brasil, o início do processo de envelhecimento populacional. Em 1980, os indicadores de fecundidade, natalidade e mortalidade tiveram seus níveis drasticamente reduzidos (VASCONCELOS; GOMES, 2012).

O país teve seu perfil demográfico transformado. De uma sociedade majoritariamente rural e tradicional, com famílias numerosas e risco de morte na infância elevado, passa-se a uma sociedade predominantemente urbana, com arranjos familiares diversos e risco de morte na infância reduzido (LEONE; MAIA; BALTAR, 2010).

A redução das taxas de fecundidade, fertilidade, natalidade e mortalidade infantil, a melhoria nas condições de saneamento e infraestrutura básica e o aumento da expectativa de vida ocasionaram uma inversão da pirâmide populacional, demonstrando um grande aumento da longevidade do ser humano (SILVA *et al.*, 2012).

Dados mostram que a revolução demográfica brasileira constitui uma conquista e uma responsabilidade para os gestores públicos e para a sociedade. É de extrema importância investir na promoção da autonomia e da vida saudável desse grupo social, assim como prover atenção adequada às suas necessidades (MINAYO, 2012).

Em virtude de todos esses fatores, pode-se observar um aumento da incidência das doenças que cursam com o envelhecimento, entre elas pode-se se citar as doenças cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus, doenças respiratórias crônicas. A doença eleita para o presente estudo foi a osteoporose, por se tratar de um problema de Saúde Pública. A osteoporose passou a ser foco de atenção mundial. Foi por muito tempo considerada uma doença da mulher e, atualmente, em virtude da incidência significativa de fraturas osteoporóticas no sexo masculino, já se reconhece que a osteoporose é também uma questão de Saúde Pública para o homem (OLIVEIRA, 2002; GUARNIERO; OLIVEIRA, 2004; SILVA, *et al.*, 2015).

Com o aumento da incidência da osteoporose na população idosa, pode-se verificar claramente o aumento do risco de fraturas. A osteoporose é caracterizada por uma redução da resistência óssea, aumentando a suscetibilidade do indivíduo para a ocorrência de fraturas. O objetivo do tratamento da osteoporose é a prevenção de fraturas. As quedas em idosos com osteoporose conduzem, frequentemente, a uma redução da qualidade de vida, com perda da independência, hospitalização, perda das capacidades funcionais e acarretam grande impacto econômico (KEAVENY *et al.*, 2007; SWIFT, 2007; CHANG *et al.*, 2010).

Com a intrínseca relação sistêmica, a população idosa é a que mais sofre com as consequências da osteoporose. Diante disso, com o aumento da expectativa de vida previsto, haverá um crescente aumento do impacto da doença nos próximos anos (KANIS *et al.*, 2005).

## 1.2 Osteoporose

Em 1830, Jean Georges Chretien Frederic Martin Lobstein, patologista francês observou, em estudo histológico de um osso osteoporótico, rarefação óssea, principalmente, quando havia fraturas decorrentes de baixo impacto. Com base nesses conhecimentos, concluiu-se que a doença afeta toda a microarquitetura óssea, caracterizando-se por uma desordem esquelética que engloba muitas patologias (GALI, 2001; SOUZA, 2010).

A osteoporose, que significa “osso poroso”, é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela redução da densidade mineral óssea, acarretando um aumento da fragilidade óssea, o que propicia um elevado risco de fraturas, tendo maior prevalência em idosos. Ocorre, portanto, a partir da quarta década de vida, uma lenta perda óssea, com um predomínio da reabsorção sobre a formação óssea (SOUZA, 2010; CAMARGOS; BONFIM, 2017).

Dentre os fatores de risco, podem-se citar a idade avançada, a raça caucasóide, o sexo feminino, o histórico familiar de osteoporose, as desordens metabólicas, a baixa ingestão de cálcio e de vitamina D e o sedentarismo.

Os fatores de risco mais importantes relacionados à osteoporose e a fraturas na pós-menopausa são: idade, sexo feminino, etnia branca ou oriental, história prévia pessoal e familiar de fratura, baixa densidade mineral óssea (DMO) do colo de fêmur, baixo índice de massa corporal, uso de glicocorticoide oral (dose  $\geq 5,0\text{mg/dia}$  de prednisona por período superior a três meses), fatores ambientais, inclusive o tabagismo, a ingestão abusiva de bebidas alcoólicas ( $\geq$  três unidades ao dia), inatividade física e a baixa ingestão dietética de cálcio (COSMAN *et al.*, 2014).

Camargos e Bomfim (2017) puderam observar no resultado de seus estudos que no ano de 2008, ao nascer, um homem poderia esperar viver, em média, 69,1 anos e, desses, 1,3 ano seria vivido com osteoporose. No caso das mulheres, a esperança de vida é de 76,7 anos e a expectativa de vida com osteoporose é de 7,9 anos. Ao alcançar a idade de 60 anos, as

mulheres poderiam esperar viver, em média, por mais 22,7 anos, sendo 7,0 desses anos (31,0%) com osteoporose. Já para os homens, na mesma idade, apenas 1,3 ano (6,6%) dos 19,5 anos remanescentes seriam vividos com osteoporose.

O diagnóstico e o tratamento precoce ajudam a evitar fraturas graves. Muitas fraturas poderiam ser evitadas pelo diagnóstico da osteoporose antes da primeira fratura e, então, muitas incapacidades temporárias e definitivas poderiam ser evitadas. O diagnóstico é realizado por meio da técnica de densitometria óssea, que mede a densidade mineral óssea, e é considerado o melhor teste para sua identificação (BANDEIRA; CARVALHO, 2007).

A densitometria óssea realizada por raios-X de dupla-energia é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 1994, como padrão-ouro para o diagnóstico de osteoporose (SAMPAIO NETTO; COUTINHO; SOUZA, 2007).

A OMS definiu quatro categorias diagnósticas distintas que se relacionam com o risco de fratura, em que para cada desvio padrão que diminui, o risco de fratura duplica. O índice T corresponde à relação entre a densidade mineral óssea (DMO) do doente e o valor de DMO correspondente à população jovem e saudável de indivíduos do mesmo sexo. Essa diferença é expressa em número de desvios-padrão (DP), sendo o limiar de 2,5 desvios-padrão de diferença considerado diagnóstico de osteoporose (Quadro 1). O critério de diagnóstico em questão deve ser aplicado a mulheres caucasianas na pós menopausa e também em indivíduos do sexo masculino com idade igual ou superior a 65 anos (TAVARES *et al.*, 2007).

**Quadro 1. Definição da Osteoporose pela OMS baseada em Valores da Densitometria óssea (DMO).**

DEFINIÇÃO	VALOR DA DMO
Normal	Até -1DP da média do adulto jovem
Osteopenia	Entre -1 e -2,5 DP
Osteoporose	Abaixo de -2,5 DP
Osteoporose Grave	Abaixo de -2,5 DP, na presença de uma ou mais fraturas por fragilidade

Fonte: dados obtidos da Organização Mundial de Saúde, Geneva (1994).

Para a determinação de risco de cada indivíduo, pode ser útil a aplicação de índices de risco como a Ferramenta de Avaliação de Risco de Fratura (FRAX). A ferramenta FRAX Brasil é o primeiro modelo de predição de fraturas específico do país. Baseia-se, na metodologia FRAX original, que foi validada externamente em várias coortes independentes, e calibrada com os dados epidemiológicos retrospectivos de fratura de quadril e de mortalidade mais consistentes disponíveis (ZERBINI *et al.*, 2015).

FRAX é um algoritmo que calcula a probabilidade em 10 anos da ocorrência de fratura osteopórotica maior (fratura de quadril, vertebral, úmero e punho) (BOONEN, 2010).

Esse instrumento tem em conta os seguintes fatores: idade, sexo, história de fratura de fragilidade prévia, história de fratura da anca nos progenitores, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo atual, uso de corticóides, diagnóstico de artrite reumatoide, a existência de osteoporose secundária e o valor de densidade mineral óssea. A probabilidade de fratura é calculada a partir dos seguintes fatores clínicos de risco: idade, sexo, índice de massa corporal e fatores de risco dicotômicos que compreendem fratura de fragilidade prévia, história parental de fratura de quadril, tabagismo atual, uso de glicocorticoides orais de longo prazo, artrite reumatoide, outras causas de osteoporose secundária e consumo de álcool. A DMO do colo femoral pode ser, opcionalmente, inserida para melhorar a predição do risco de fratura. A probabilidade de fratura é calculada considerando tanto o risco de fratura, quanto o risco de morte (RADOMINSKI *et al.*, 2017).

O uso de fatores clínicos de risco e as medidas da DMO melhoram a sensibilidade da predição de fraturas sem comprometer a especificidade. Todos os pacientes, com diagnóstico de osteoporose devem ser avaliados para fatores de risco, antes do início do tratamento, por meio de história e de exame físico minucioso e exames laboratoriais mínimos. Testes laboratoriais específicos devem ser solicitados para diagnóstico de causas de osteoporose secundária, de acordo com a suspeita clínica. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. A fácil acessibilidade, uma vez que se encontra disponível *online*, e a fácil interpretação pelos doentes, constituem duas grandes vantagens deste

instrumento (BOONEN, 2010; RADOMINSKI *et al.*, 2017).

O tratamento deve ter por base a fisiopatologia da doença. Assim, na prevenção ou no tratamento da osteoporose, deve haver diminuição da atividade do osteoclasto ou aumento da atividade do osteoblasto, ou os dois. O tratamento ideal é aquele que diminui a incidência de fraturas por melhorar a geometria do osso e sua microarquitetura. O tecido ósseo recém-formado deve ter boa qualidade celular e de matriz, mineralização normal com boa proporção entre osso mineralizado (resistente mecanicamente) e não mineralizado (flexível) e sem acúmulo de danos. O tratamento ideal deve ter taxa de remodelação positiva e efeito terapêutico rápido e duradouro. Esse efeito deve ser facilmente detectável (SOUZA, 2010).

Quando há o diagnóstico da osteoporose, o tratamento medicamentoso é essencial, principalmente na prevenção de fraturas graves como as vertebrais, de quadril e de fêmur. São vários os tratamentos utilizados para a osteoporose, como uso combinado de cálcio e vitamina D, considerado um tratamento básico da doença. Outro tratamento habitualmente utilizado é o uso do bisfosfonato (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2011; BRANDÃO; MACHADO; ACURCIO, 2012).

*Food in Drugs Administracion* (FDA) dos Estados Unidos aprovou várias terapias com drogas para redução de fraturas osteoporóticas, incluindo bifosfonato, paratohormônio, ralocifeno e estrôgenio. A escolha da terapia é individual e depende da situação clínica do paciente (COHEN, 2018).

A droga eleita para o estudo desse trabalho foi o ácido zoledrônico (AZ). Este ácido pertence a terceira geração da classe dos bifosfonatos e é caracterizado por possuir uma grande potência antirreabsortiva.

### **1.3 Hidrocortisona e sua relação com osteoporose**

Os corticoides são utilizados para tratamento de várias doenças, entre elas, doenças com processos autoimunes e alérgicos; transplante de órgãos; insuficiência adrenal e hiperplasia adrenal congênita. É considerado um potente anti-inflamatório. No entanto, o uso prolongado desses

medicamentos com altas doses trazem efeitos colaterais que podem trazer três complicações principais quando há interrupção de maneira inadequada: insuficiência adrenal secundária à supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, síndrome de retirada ou de privação dos corticoides e reativação da doença de base (ALVES; ROBAZZI; MENDONÇA, 2008).

Os corticoesteróide diminuem a inflamação de forma sistêmica, resultando em supressão do sistema imunológico. O uso prolongado de esteroides injetáveis é conhecido por causa dos seus efeitos colaterais, incluindo osteoporose (perda da densidade óssea), elevação dos níveis de açúcar no sangue, dificuldade no controle da diabetes, ganho de peso, distúrbios do sono, hipertensão, entre outros (MONEY, 2017).

Vários fármacos contribuem ou exacerbam a patologia osteoporótica, com particular destaque para os glucocorticóides, encarados como a causa mais comum de osteoporose secundária. Dos efeitos resultantes da administração prolongada de corticóides, sobressaem aqueles que motivam o decréscimo da formação óssea, através da diminuição do número de osteoblastos, da indução da apoptose de osteoblastos maduros, da diminuição da síntese de matriz e do aumento da diferenciação dos adipócitos na medula óssea. São responsáveis, ainda, pelo aumento da osteoclastogênese, possivelmente devido a uma diminuição da osteoprotegerina e ao aumento da produção do RANKL (O processo de remodelação óssea é regulado pelo sistema RANKL/RANK/osteoprotegerina). Supõe-se que, além das implicações na quantidade de osso, sobretudo no osso trabecular, a qualidade também afeta o aumento no turnover ósseo e a perfuração trabecular. Um outro mecanismo pelo qual os diversos fármacos referidos interferem no turnover ósseo é por meio da limitação da absorção intestinal de cálcio, gerando-se um estado de hiperparatiroidismo secundário à diminuição sérica deste íon. Devido à produção endógena da suprarrenal aumentar com a idade, a perda de massa óssea pelo uso crônico destes fármacos é acelerada. Estes glucocorticóides endógenos associam-se à uma diminuição na vascularização e hidratação óssea, o que provoca a diminuição na resistência do osso (MARIE. KASSEM, 2011).

O risco de osteoporose induzida por glicocorticoides é semelhante em homens e mulheres, e as consequentes fraturas osteoporóticas e prejuízos nas atividades da vida diária resultam em enormes perdas econômicas em nível nacional. Pacientes, com doença autoimune, podem ter um alto risco de fratura osteoporótica. Uma meta-análise revelou perda de densidade mineral óssea após o tratamento a longo prazo com baixas doses de glicocorticóides em pacientes com artrite reumatóide (KONNO *et al.*, 2015).

Há estudos comprovando que mais de 10% dos pacientes, que realizaram tratamento prolongado com corticoides, são diagnosticados com, pelo menos, uma fratura, sendo principalmente fraturas de vertebras. O grau elevado de perda óssea ocorre dentro dos primeiros 3 a 6 meses de tratamento e há um declínio mais lento e progressivo com o uso persistente dessa medicação (BUCKLEY *et al.*, 2017).

A osteoporose induzida por glicocorticóides afeta predominantemente as regiões do esqueleto que têm osso esponjoso abundante, como a coluna lombar e proximal fêmur. Em doentes com osteoporose induzida por glucocorticoides, a perda de minerais e da densidade é bifásica; ocorre rapidamente (6 a 12% de perda) no primeiro ano e mais lentamente (aproximadamente 3% de perda anual) a partir de então. No entanto, o risco de fratura aumenta em até 75% nos primeiros 3 meses, após o início da terapia, tipicamente antes de haver um declínio substancial na densidade mineral óssea, sugerindo que existem efeitos adversos dos glicocorticoides no osso que não são capturados densitometria óssea (WEINSTEIN, 2011).

A osteoporose induzida por corticoides é a causa mais frequente de osteoporose secundária, que corresponde a 25% de todas as causas de osteoporose. Dos pacientes que realizam corticoterapia por mais de 6 meses, 50% desenvolvem osteoporose e 1/3 deles sofrem fraturas, caso o tratamento se prolongue por 1 ano (GUTIÉRREZ-POLO, 2005).

## 1.4 Tecido ósseo

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo complexo, cuja matriz extracelular é calcificada e contém as células que a secretaram, mas que mantém certo grau de elasticidade (PEREIRA, 2012).

O tecido ósseo é uma estrutura complexa que compõe estruturalmente o corpo, possui a função de ser ponto de fixação entre tendões, ligamentos e músculos esqueléticos. A matriz óssea é composta aproximadamente 40% por componente orgânico e 60% por componente inorgânico. O componente orgânico, consiste, principalmente, em colágeno tipo 1, o qual fornece resistência à tração, intercalado por proteoglicanos e outras proteínas da matriz, como osteocalcina e osteopontina. Essas proteínas são secretadas por osteoblastos, que são diferenciados do mesênquima ósseo de células-troncos. O componente inorgânico, que é o componente mineralizado composto por hidroxiapatita de cálcio, é o responsável pela resistência mecânica (KONG *et al.*, 2018).

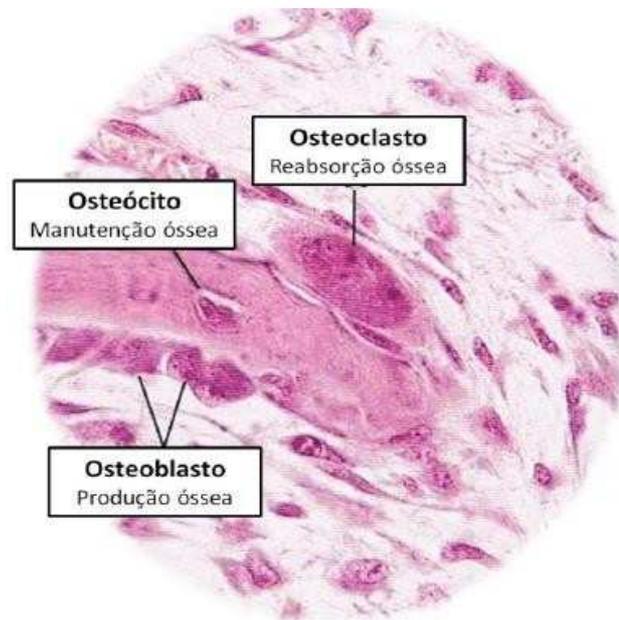
Os cristais de hidroxiapatita estão dispostos de um modo ordenado ao longo das fibras de colágeno tipo I, depositados nas regiões lacunares do colágeno, mas também estão presentes ao longo das regiões de sobreposição. Já o componente orgânico da matriz óssea inclui fibras que são, quase exclusivamente, de colágeno do tipo I. A resistência e força desse tecido são determinadas pela associação das fibras de colágeno com o componente inorgânico da matriz, que diz respeito essencialmente aos cristais de hidroxiapatita (MARIE; KASSEM, 2011; GARTNER; HIATT, 2007).

Os ossos desempenham a função de proteção de órgãos internos vitais e de suporte aos músculos, permitindo os movimentos do esqueleto. Além disso, é um reservatório de vários minerais do corpo, a saber, armazena cerca de 99% do cálcio do corpo (GARTNER; HIATT, 2007).

O tecido ósseo é formado por células e material extracelular calcificado: a matriz óssea. As células são os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos. Os osteócitos encontram-se localizados profundamente nas fibras protéicas da matriz óssea estando, provavelmente, envolvidos na homeostase do cálcio plasmático. Os osteoblastos são as células que

sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea, são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Já os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas. A função dos osteoclastos é a reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

**Figura 1 – Aspecto dos tipos celulares envolvidos na remodelação óssea.**



Fonte: Adaptado de Gartner e Hiatt (2007).

Obs.: Os osteoblastos são os responsáveis pela produção de novo osso, os osteócitos importantes na manutenção da massa óssea e os osteoclastos participam na reabsorção óssea.

As células do tecido ósseo podem ser agrupadas em duas séries diferentes e o processo de diferenciação das células da linha osteoclástica está muito controlado pelas células da linha osteoblástica, através de um eixo de regulação comum, vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG. O equilíbrio entre formação e reabsorção óssea está na dependência das flutuações locais da razão RANKL/OPG (JUDAS *et al.*, 2012).

O ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$  (RANKL), produzido pelos osteoblastos, linfócitos T e linfócitos B, liga-se ao recetor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$  (RANK). Esse receptor encontra-se nas células da linhagem osteoclástica, ativadas pela ligação RANKL-RANK,

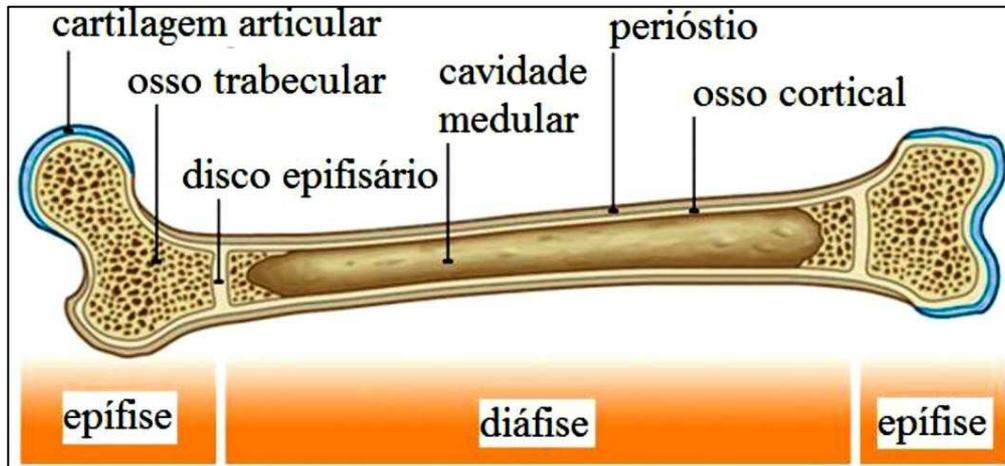
acionando um processo designado por osteoclastogênese. A osteoprotegerina, produzida também pelos osteoblastos, pertence à família do fator de necrose tumoral e é responsável pela inibição da ligação RANKL-RANK, impedindo-o dessa forma, a reabsorção óssea. Nos doentes com osteoporose, verifica-se uma correlação positiva entre o valor da osteoprotegerina e a densidade mineral óssea da coluna lombar, indicando que poderá constituir um eventual preditor da perda óssea no idoso (GARTNER; HIATT, 2007; PIETSCHMANN *et al.*, 2009).

Segundo Gartner e Hiatt (2007), os ossos são classificados pela sua forma anatômica, apresentando a seguinte classificação:

- ossos longos: possuem um corpo situado entre duas epífises (por exemplo, tíbia e fêmur).
- ossos curtos: possuem aproximadamente a mesma largura e o mesmo comprimento (por exemplo, ossos do carpo do punho).
- ossos chatos: são achatados, delgados e semelhantes a uma placa (por exemplo, ossos que formam a caixa craniana).
- ossos irregulares: têm uma forma irregular e não pode ser incluído nas outras classes (por exemplo, ossos esfenoide do crânio).
- ossos sesamóides: formam-se dentro de tendões (por exemplo, patela).

O corpo de um osso longo é denominado diáfise, e as extremidades articulares são denominadas epífises (cabeças) (Figura 2). A extremidade articular do osso é dilatada e esculpida de modo a se articular com sua contraparte óssea da articulação. A superfície da extremidade articular é coberta somente por uma delgada camada de osso compacto, subjacente ao osso esponjoso. Em cima dessa camada, fica a cartilagem hialina articular, altamente polida, que reduz a fricção ao se movimentar contra a cartilagem articular da contraparte óssea da articulação. A área de transição entre a placa epifisária e a diáfise é denominada metáfise, em que ficam localizadas colunas de osso esponjoso. A placa epifisária e a metáfise são responsáveis pelo crescimento do osso em comprimento.

Figura 2 - Ilustração da localização dos tecidos que compõem o osso longo.



Fonte: Pereira (2012, p.13).

A observação macroscópica do fêmur, cortado longitudinalmente, mostra dois tipos diferentes de estrutura óssea: cortical e trabecular. A superfície externa é constituída por osso compacto e praticamente sem medula. Revestindo o osso cortical, encontra-se o perióstio, uma membrana que contém osteoblastos em sua face interna (JACOBS, 2000).

O osso trabecular é a porção porosa da cavidade medular e é encontrado interiormente nas extremidades dos ossos. É menos denso e mais elástico que o osso cortical, possui porosidade de 50% a 90%. As trabéculas se alinham de acordo com direcionamento das forças exercidas. A observação mais íntima do osso esponjoso mostra trabéculas ósseas ramificadas e espículas projetando-se da superfície interna do osso compacto para a cavidade da medula. Não há sistemas de Havers (sistema funcional fundamental) no osso esponjoso, mas há arranjos irregulares de lamelas. Essas contêm lacunas abrigando osteócitos, que são nutridos por difusão da cavidade medular (JACOBS, 2000; GIBSON, 2003).

Segundo Mohan e Baylink (1991), o metabolismo ósseo é mantido por um processo de reabsorção e de neoformação. Para o controle desse processo, dois mecanismos têm sido postulados: a regulação sistêmica, por meio de hormônios reguladores da taxa de cálcio e fosfato e a regulação local, na qual ocorre a participação de fatores de crescimento que atuam

sobre todas as células de estrutura óssea, auxiliando no reparo ósseo.

A remodelação óssea consiste num mecanismo de substituição ou reconstrução de áreas de tecido ósseo de modo a preservar e a aperfeiçoar a sua função, prevenindo sua degradação. A substituição óssea é iniciada por uma fase de reabsorção osteoclástica, logo seguida por uma etapa de formação osteoblástica. O ciclo de remodelação compreende uma série ordenada de eventos que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação seguindo uma sequência imutável de ativação que consiste na eliminação da área de tecido ósseo que será substituída por outra, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea (PEREIRA, 2010).

Em condições de normalidade, a dinâmica óssea permite a manutenção da homeostasia, obtendo-se um equilíbrio entre a atividade dos vários tipos celulares e, conseqüentemente, uma harmonia entre a produção e a reabsorção do osso, resultando numa estrutura óssea estável (GARTNER; HIATT, 2007).

### **1.5 Fratura do fêmur e consolidação óssea**

Durante o envelhecimento, há um comprometimento no turnover ósseo, com impacto quer na estrutura quer nas propriedades dos constituintes do osso, elevando-se, desse modo, o risco de fratura. Enquanto no esqueleto de um indivíduo jovem e saudável, a taxa de formação óssea iguala à taxa de reabsorção, com o decorrer da idade esse balanço é modificado, no sentido de beneficiar a reabsorção óssea em relação à produção (SYED; NG, 2010).

No processo de envelhecimento, as fraturas de fêmur em pessoas com idade igual ou superior a 60 anos (idosos) representam um grande impacto para a saúde pública e estão associadas à elevada morbimortalidade e grandes custos socioeconômicos. Entre as fraturas, as mais comuns são as de fêmur para as quais a osteoporose é um importante fator de risco, justificando sua maior ocorrência entre as mulheres com idade igual ou superior a 60 anos (DORE *et al.*, 2013; SOARES, *et al.*, 2014).

Em pacientes com menos de 40 anos, as fraturas da diáfise femoral apresentam uma incidência anual de 1 a 4:10.000 pessoas e ocorrem, principalmente, devido a traumas de alta energia, que podem ser observados em ferimentos por arma de fogo, queda de grande altura e acidentes de trânsito. Já na população idosa, acima de 60 anos, ocorre por acidentes de baixa energia como as quedas da própria altura que representa as lesões traumáticas mais comuns que acometem as regiões proximal, distal e a diáfise femoral (KUPCZIK *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2009).

O fêmur é o maior osso do corpo e está envolto por grandes massas musculares. Em relação aos traumas de membros inferiores, são responsáveis por importante morbidade e mortalidade (BUCHOLZ; BRUMBACK, 1993; HEBERT *et al.*, 2003).

Segundo Kupczik *et al.* (2009), as fraturas de fêmur podem ser fechadas ou expostas e seu tratamento é predominantemente cirúrgico por meio da fixação interna ou externa que proporcionam estabilidade necessária para a consolidação óssea.

A fixação interna promove estabilidade, permite mobilidade livre e indolor das articulações e algum suporte de carga. Porém, não pode ser utilizada nos casos de fraturas muito proximais ou distais na diáfise. Com os avanços recentes, tem-se a haste intramedular bloqueada, que atinge qualquer nível da diáfise femoral (REIS, 2007).

Segundo Orr *et al.* (2002), é consenso que as lesões ósseas devem ser fixadas o quanto antes, por promoverem melhora das condições hemodinâmicas, proteção às estruturas adjacentes ao foco dessa fratura e mobilização precoce do paciente.

Historicamente, têm-se desenvolvido métodos de tratamento cirúrgico, baseados nos conceitos de fixação biológica das fraturas que orientam o menor manuseio do invólucro do fêmur com o intuito de preservar a sua vascularização e conseqüente melhor capacidade de consolidação óssea (FALAVINHA, 1996).

Estudo comparativo de haste intramedular e a placa ponte para o tratamento das fraturas multifragmentárias do fêmur de 119 pacientes

mostrou que esses métodos de osteossíntese são eficientes com bons e excelentes resultados clínicos, alto índice de consolidação das fraturas e baixos índices de complicações (FERNANDES *et al.*, 2002).

Já as hastas bloqueadas possuem vantagens biomecânicas quando comparadas a outras técnicas de imobilização, visto que permitem a estabilização rígida das fraturas e preservam os padrões biológicos de osteossíntese (ROMANO *et al.*, 2008).

No concernente ao tratamento conservador, esse só acontece em raras circunstâncias quando o hospital não possui material mínimo adequado, o médico não está habilitado para esse tipo de intervenção ou nos casos de processos infecciosos. Mesmo assim o tratamento conservador é temporário, e o paciente deve ser transferido para um centro melhor adaptado para o tratamento dessa fratura (HEBERT *et al.*, 2003).

A consolidação óssea é um processo complexo que envolve múltiplas fases que se superpõem. No tecido ósseo, existe uma complexa interação de fatores reguladores locais e sistêmicos. Esses mediadores promovem equilíbrio contínuo entre formação e reabsorção. A ocorrência de uma fratura culmina na quebra desse equilíbrio e a partir desse momento, uma série de eventos intra e extracelulares vão ocorrer com o objetivo de reparar o tecido lesado (GUARNIERO *et al.*, 2007; SANTOS, 2011).

A formação de tecido ósseo é influenciada por muitos fatores, sendo o principal o suprimento sanguíneo, pois proporciona a oxigenação tecidual e, conseqüentemente, a formação colágena, a proliferação de fibroblastos e capilares, a atividade de osteoblastos e osteoclastos, além da formação e da mineralização no calo ósseo. Outros fatores influenciam nos processos de reparo ósseos como Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF- $\beta$ 1), Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e Proteína Morfogenética Óssea (BMPs) (KOPSCHINA, 2010).

A consolidação das fraturas de ossos tubulares pode ser dividida em seis estágios. No primeiro estágio, também chamado de hematoma, ocorre um extravasamento de sangue nos vasos rompidos para o periósteo,

que ocorre após algumas horas e pode se estender por dias. O segundo estágio, ou estágio inflamatório, caracteriza-se pela formação de um exsudato serofibrinoso e o aumento de células antecessoras dos osteoblastos, que começam a reabsorver o tecido ósseo necrosado, dois dias após a fratura.

O terceiro estágio caracteriza-se pela formação de tecido de granulação que atua na angiogênese e na organização dos tecidos e estruturas e ocorre entre o segundo e o décimo segundo dia, após a fratura. A partir do quarto estágio, inicia-se o processo de consolidação óssea. Esse estágio é evidente após a primeira semana e pode durar vários meses. Nessa fase, o calo ósseo encontra-se mole ou fibroso e vai gradativamente se transformando em calo duro, o calo ósseo propriamente dito. No quinto estágio, o calo ósseo está formado. No sexto estágio, chamado de estágio de remodelação, o osso maduro é substituído por tecido ósseo lamelar. Esse processo se dá em todos os indivíduos ao longo da vida, sendo mais evidente nos meses que sucedem uma fratura (SCHWARTSMANN; LECH; TELÖKEN, 2003).

O processo de regeneração óssea pode ser dividido em três estágios principais: fase inflamatória, reparo e remodelação. A inflamatória inicia-se logo após a fratura e ocorre durante ainda 2 a 3 semanas. Caracteriza-se por processo inflamatório já que no exsudato do hematoma contêm diversos fatores inflamatórios, angiogênicos e de crescimento liberados por componentes sanguíneos, como as plaquetas, células locais, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Daí a importância de conservar e estimular o fluxo sanguíneo à matriz óssea (MENDES *et al.*, 2001).

O processo cicatricial não ocorre sem a angiogênese. O fator de crescimento vascular endotelial atua induzindo a angiogênese, etapa fundamental para a osteogênese. Isso porque é fundamental garantir suprimento nutricional, bem como suprimento de fatores sanguíneos para o remodelamento ósseo (RIBEIRO, 2015).

Uma característica marcante nos processos iniciais da osteogênese é a proliferação de células do perióstio próximo ao local da fratura. Essas

células são precursoras dos osteoblastos, sendo estes os responsáveis por todo o processo de osteogênese, atuando como mediador do crescimento da substância intercelular. Com o surgimento do tecido celular, há o amadurecimento celular, originando osteoblastos ou condroblastos. Como já citado, os osteoblastos serão imprescindíveis para a síntese da substância óssea, depositando uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que se junta sais de cálcio, formando o osso primário, formando posteriormente a estrutura amadurecida denominada calo ósseo. Esse calo, posteriormente, será reabsorvido e remodelado pela ação catalítica dos osteoclastos (SOUSA, 2003; FERREIRA; BANSI; PASCHOAL, 2014).

Algumas drogas como a hialuronidase, esteróides anabolizantes, insulina, condroitina sulfato, hormônio do crescimento, calcitonina, hormônios tireoidianos e vitaminas A e D atuam estimulando a consolidação óssea; em contrapartida drogas como corticosteróides, anticoagulantes, tiouracil e vitaminas A e D em altas doses atuam retardando a consolidação (GIORDANO *et al.*, 1999).

O uso de corticosteróides retarda o processo de reparo das fraturas, pois diminui a formação do hematoma fraturário, limitando a fase inflamatória; retarda a produção de tecido cartilaginoso que seria substituído posteriormente por osso trabecular. A resposta inflamatória é indispensável no processo de reparação. Sem a inflamação, não seria possível a cicatrização dos tecidos (MENDES *et al.*, 2001; SANTOS, 2011).

Giordano *et al.* (1999) realizaram um estudo experimental em ratos, em que estudaram a influência da enoxaparina na consolidação das fraturas e concluíram que essa droga estimulou a formação de calo ósseo em fases intermediárias de sua formação.

## **1.6 Ácido zoledrônico**

O ácido zoledrônico pertence à classe dos bifosfonatos (BFs). Os primeiros BFs foram sintetizados por Von Bayer e Hofmann. Devido à propriedade de inibirem a precipitação de sais de cálcio. A primeira aplicação desse grupo de fármacos foi como agentes anticorrosivos, não sendo

descritos efeitos potencialmente terapêuticos. O conhecimento de suas características biológicas data da década de 60 (FLEISCH, 2002; NOVARTIS, 2016).

Os Bisfosfonatos (BFs) são agentes antirreabsortivos, com diferentes mecanismos de ação osteoclástica e têm sido usados amplamente para tratamento de osteoporose, bem como em tratamentos de metástases ósseas, mieloma múltiplo e doença de Paget, promovendo boa eficácia terapêutica nessas doenças (LANG *et al.*, 2016).

Os BFs apresentam, na sua estrutura, dois grupos fosfatos ligados a um átomo de carbono central (P-C-P) e duas cadeias laterais (R1 e R2), unidas ao carbono central. A estrutura P-C-P, juntamente com as cadeias laterais, permitem um grande número de variações possíveis, daí surgirem vários tipos de bifosfonatos (JACOBSEN; ZWAHLEN; GRATZ, 2006).

São análogos químicos da substância endógena, denominada ácido pirofosfórico, que, no organismo, se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. No entanto, essa substância não pode ser utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois sofre uma rápida hidrólise enzimática. Os BFs são seus análogos sintéticos, em que o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono. Essa modificação faz com que os BFs sejam mais resistentes à degradação enzimática e possuam uma meia-vida biológica maior, suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (LICATA, 1997; KHAJURIA; RAZDANA; MAHAPATRAB, 2015).

Os BFs desaparecem rapidamente da circulação, unem-se aos minerais dos ossos e concentram-se, seletivamente, em osso. Se não forem incorporados na matriz mineral dos ossos, os BFs são eliminados através da urina. São forte inibidores da atividade osteoclástica. Todos os compostos dos BFs acumulam-se por longos períodos de tempo na matriz óssea mineralizada. Dependendo da duração do tratamento e do BF específico prescrito, esse fármaco pode manter-se anos no nosso organismo (LIN, 1996; GREEN, 2001).

Os bifosfonatos possuem propriedades antiangiogênicas e podem ser diretamente tumoricidas, tornando-os importantes agentes no tratamento do câncer (MARTIN *et al.*, 2001).

Segundo Green (2001), os BFs inibem a proliferação, reduzem a viabilidade e induzem a apoptose em muitas células tumorais humanas.

Os bifosfonatos podem dividir-se em duas subclasses, conforme uma de suas cadeias laterais possuírem ou não uma ligação nitrogenada (KUMAR *et al.*, 2007).

Existem três gerações de BFs. Os BFs da primeira geração (medronato, clodronato e etidronato) não possuem ligação nitrogenada e são menos potentes. Os BFs da segunda geração, também chamados de aminobifosfonatos (alendronato e pamidronato), são de 10 a 100 vezes mais potentes que os da primeira geração. E os da terceira geração (risedronato e zoledronato) são os mais modernos, cerca de 10.000 a 100.000 vezes mais potentes que os da primeira geração e possuem efeitos mais prolongados. Os BFs de segunda e de terceira geração por conterem o nitrogênio em sua fórmula química, são chamados de nitrogenados (FRIEDMAN, 2006).

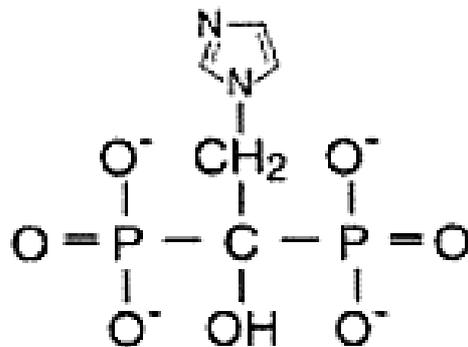
Os BFs nitrogenados (pamidronato, alendronato, residronato, ibandronato e ácido zoleidrônico) são considerados mais potentes, pois inibem a via do mevalonato, bloqueando a enzima farnesil-difosfato sintetase, o que resulta numa alteração da membrana celular lipídica do osteoclasto, levando a uma alteração do seu mecanismo celular, provocando a apoptose osteoclástica (KUMAR *et al.*, 2007).

Em geral, os BFs são bem tolerados se forem administrados corretamente, porém existem relatos de efeitos adversos associados ao seu uso. No caso dos BFs orais, os efeitos adversos mais frequentes são úlceras gástricas, esofagites e osteomalacia. Os intravenosos são similares aos orais, tendo sido descrito alguns casos de flebites, anemia, edema, fadiga e síndromes pseudogripais. Doses endovenosas elevadas podem causar problemas renais, como falência renal e necrose tubular aguda (VERA *et al.*, 2007).

O efeito adverso mais sério da terapia com os BFs é a osteonecrose associada ao uso deste fármaco, em região de mandíbula e maxila, antes conhecida como osteonecrose associada ao uso de bifosfonatos ou *Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw* (BRONJ) e atualmente denominada osteonecrose associada ao uso de medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos - *Medication Related Osteonecrosis of the Jaw* (MRONJ) (SENTÜRK *et al.*, 2016).

O ácido zoledrônico pertence a terceira geração dos BFs, sendo considerado atualmente o mais potente. Esse ácido possui dois átomos de nitrogênio em um anel imidazol heterocíclico (Figura 3). Há forte evidência de que os BFs, à base de nitrogênio, exercem seus efeitos celulares por meio da inibição específica de uma enzima na via do mevalonato, a farnesil difosfatossintase (FPPS). O mecanismo de ação dos BFs que possuem nitrogênio é a inibição da remodelação óssea mediada pelos osteoclastos, por prevenir a prenilação de algumas proteínas formadas na via metabólica da síntese de colesterol.

**Figura 3 – Estrutura do ácido zoledrônico.**



Fonte: Leish (2007).

O ácido zoledrônico pode ser infundido por via intravenosa por um tempo mais curto (15-20 min) e volume (soro fisiológico ou glicosado) mínimo de 100 ml. A característica química desse ácido prolonga sua meia-vida no osso e permite exercer seu efeito no esqueleto durante meses e talvez anos após sua administração. É importante ressaltar que uma característica típica da classe dos BFs é sua pobre absorção, quando administrada por via oral, variando de 0,5 a 3% especialmente na presença de alimentos. Esse ácido é

considerado a melhor opção de tratamento devido a sua maior potência e remissão prolongada, em uma única infusão de curto tempo. É utilizado no tratamento da hipercalcemia de malignidade, e ainda se mostra de grande eficácia no tratamento da osteoporose pós-menopausa, osteoporose induzida por corticóide e doença de Paget (GRIZ; COLARES; BANDEIRA, 2006).

Siris *et al.* (2006) demonstraram que o uso de BFs reduz o risco da ocorrência de fraturas em pacientes osteoporóticos, sendo considerado o tratamento de escolha e observaram que a eficácia do tratamento da osteoporose é comprometida pelos baixos níveis de aderência e persistência.

Araujo *et al.* (2008) concluíram que uma alta aderência no tratamento é necessária para minimizar os riscos de fraturas e que o uso de uma medicação anual é necessária para melhorar da relação aderência-efetividade.

Os BFs orais têm uma baixa absorção no trato gastrointestinal, por esse motivo os pacientes devem ingeri-los em jejum com 200 ml de água. Após a ingestão, devem ficar de 30 a 60 minutos, na posição ereta para evitar a esofagite. Por esse motivo, o uso do ácido zoledrônico anual torna-se mais interessante, havendo uma maior aderência do paciente no tratamento.

Ragi-Eis *et al.* (2007). observaram que a maioria das pacientes preferiu o esquema de administração de apenas uma vez por mês do ibandronato ao esquema semanal do alendronato. Concluindo que as percepções de preferência e conveniência das pacientes sobre o esquema posológico também deveriam ser levadas em consideração ao se prescrever um bisfosfonato oral, podendo causar um impacto favorável em relação à adesão ao tratamento.

Lewiecki *et al.* (2007) mostram que o ibandronato oral, uma vez por mês, é essencialmente semelhante ao alendronato oral uma vez por semana em termos de melhora da densidade mineral óssea (DMO) do quadril total, do trocânter e do colo femoral após 12 meses.

Miller *et al.* (2008), mostraram que o ibandronato uma vez por mês é clinicamente comparável ao alendronato uma vez por semana para aumentar a DMO na coluna lombar e no quadril após 12 meses.

Black *et al.* (2007) em seu estudo sobre o uso do ácido zoledrônico no tratamento da osteoporose pós-menopausa, concluiu que uma infusão anual de ácido zoledrônico 5 mg em um período de três anos; reduz significativamente o risco de fraturas vertebrais, de quadril e outros tipos; melhora a densidade mineral óssea e dos marcadores de metabolismo ósseo.

Tadakoro (2009) verificou a farmacoeconomia e custo-efetividade dos bisfosfonatos no Brasil e concluiu que o ácido zoledrônico é a melhor opção de custo, aderência e efetividade, sendo a melhor terapêutica disponível para minimizar o impacto econômico do tratamento.

O estudo do zoledronato também é largamente utilizado nos casos de complicações osteolíticas de metástases ósseas. Em modelos com ratos, o zoledronato reduz a incidência de metástases ósseas de câncer de pulmão (LU *et al.*, 2008).

Griz, Colares e Bandeira (2006), em seu estudo sobre o “Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico”, concluíram que o desenvolvimento de inibidores específicos da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, particularmente os bisfosfonatos de última geração como o alendronato, risedronato e o ácido zoledrônico, permitiu maiores chances de sucesso no tratamento da doença de Paget, mesmo nos casos mais severos, sendo, portanto, o ácido zoledrônico a melhor opção de tratamento.

Ferreira Júnior, Casado e Barboza (2007) elaboraram uma pesquisa para observar os efeitos dos bifosfonatos na reparação de fraturas em tíbias de ratas com osteoporose e concluíram, através da morfometria e histomorfometria, que foi possível constatar a melhoria na densidade óssea, na densidade trabecular óssea e espessura do calo ósseo em todos os grupos tratados, sendo que o alendronato de sódio obteve melhores resultados.

Matos, Araújo e Paixão (2007), em seu estudo, concluíram que o zoledronato estimulou acentuadamente a formação óssea na área metafisária, resultando em grande quantidade de tecido ósseo trabecular e pouca fibrose medular.

Pereira *et al.* (2009), em seu estudo sobre o efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas, concluíram que esse ácido também não teve influência significativa na massa corpórea dos animais, porém, ao se analisarem os resultados, observaram que o ácido não aumentou significativamente a resistência óssea da diáfise tibial ou área trabecular óssea diafisária.

Palacio *et al.* (2010) estudaram o zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas e concluíram que esse bifosfonato não teve influência significativa na massa corpórea dos animais. Os resultados mostraram que o zoledronato aumentou significativamente a resistência óssea do úmero proximal e a área trabecular óssea na região metafisária do úmero em ratas osteoporóticas, sendo, portanto, necessária a realização de outros estudos para se evidenciar sua eficácia em outras regiões umerais.

Khajuria *et al.* (2015), em seu estudo intitulado “Efeitos da terapia combinada com ácido zoledrônico e propranolol na resistência mecânica em um modelo de rato com osteoporose por desuso”, concluíram que terapia combinada com ZOL mais PRO deve ser recomendada para o tratamento da osteoporose por desuso.

### **1.7 Importância e justificativa**

Com o aumento da longevidade do ser humano, pode-se observar um aumento da incidência das doenças que cursam com o envelhecimento, entre elas, a osteoporose. Essa doença é caracterizada por uma redução da resistência óssea, aumentando a suscetibilidade do indivíduo para a ocorrência de fraturas. Por esse motivo, surgiu o interesse em estudar a resposta do ácido zolêdrônico no tratamento de fraturas osteoporóticas.

O resultado desse trabalho é de extrema importância para o cenário demográfico atual. As quedas em idosos com osteoporose conduzem,

frequentemente, a uma redução da qualidade de vida, com perda da independência, hospitalização, perda das capacidades funcionais e acarretam grande impacto socio econômico. A escolha do ácido zoledrônico se deve ao fato desse medicamento ser administrado por via endovenosa e em dose anual, o que facilita a adesão e a resposta do paciente ao tratamento.

Dessa forma, pode-se observar direta e mais claramente o impacto desse medicamento na reparação dessas fraturas osteoporóticas, fato que abriria uma opção para o uso deste fármaco quando o paciente estiver hospitalizado para tratar sua fratura de fêmur.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Analisar os efeitos do ácido zoledrônico na consolidação de fratura diafisária de fêmures de ratos osteoporóticos submetidos à osteossíntese intramedular.

### **2.2 Específicos**

- Mensurar a área do calo ósseo nas fraturas de fêmures de ratos osteoporóticos do grupo tratado com o ácido zoledrônico e do grupo não tratado.
- Quantificar a formação de colágeno nas fraturas de fêmures de ratos osteoporóticos do grupo tratado com o ácido zoledrônico e do grupo não tratado.
- Comparar a formação do calo ósseo dos animais osteoporóticos tratados com o ácido zoledrônico, com o calo ósseo dos animais osteoporóticos não tratados em cada sub-grupo.
- Identificar as diferenças entre a formação de colágeno dos animais osteoporóticos tratados com ácido zoledrônico, e os animais osteoporóticos não tratados em cada subgrupo.

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) do Centro Universitário Christus (Unichristus), no Protocolo de número 041/17 (Anexo 1) aprovado no dia 27 (vinte e sete) de setembro de 2017, conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

A pesquisa foi realizada obedecendo aos princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA).

Foram aplicadas as normas de redação do Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Todos os recursos utilizados na pesquisa são próprios do pesquisador. Não havendo conflito de interesses.

#### **3.2 Local da pesquisa**

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) da Universidade Federal do Ceará e no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro Universitário Christus (Unichristus).

#### **3.3 Caracterização da amostra**

Foram utilizados, neste estudo, 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da raça Wistar, machos, adultos (4 meses), pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Central do Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro Universitário Christus (Unichristus). Cada animal, antes do experimento, foi avaliado, sendo selecionados somente os saudáveis.

### 3.4 Ambiente de experimentação

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (opacas), específicas para a espécie, com medidas 41x34x16 e providas com tampa de aço inoxidável, para apoiar o bebedouro e a ração. Foram alojados 4 ratos adultos por gaiola. Essas eram limpas diariamente e mantidas em local seco e arejado, com temperatura ambiente controlada entre 18° e 25°C, com iluminação adequada, umidade relativa do ar de 55% e observando-se a alternância dos ciclos claro-escuro a cada 12 horas, no biotério central do Centro Universitário Christus (Unichristus) e oferta de água e alimento *ad libitum* (ração balanceada da marca Fri-Ribe® própria para animais).

### 3.5 Delineamento do estudo

Tratou-se de um estudo experimental, controlado em ratos wistar (*Rattus norvegicus albinus*), submetidos à corticoterapia (hidrocortisona) diária, via intramuscular, na região posterior da coxa esquerda, com seringa de 1mL e agulha 13 x 0,45 mm, com dosagem de 18 mg/kg/dia, por um período de 28 dias, de acordo com o estudo de Jamacaru (2006), com a finalidade de induzir a osteoporose.

Após a administração de hidrocortisona por um período de 28 dias, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, em que foi realizada osteossíntese intramedular com fio de Kirshner de 1.0 , e posteriormente a produção de fratura de fêmur numa guilhotina romba (TEIXEIRA, 2010).

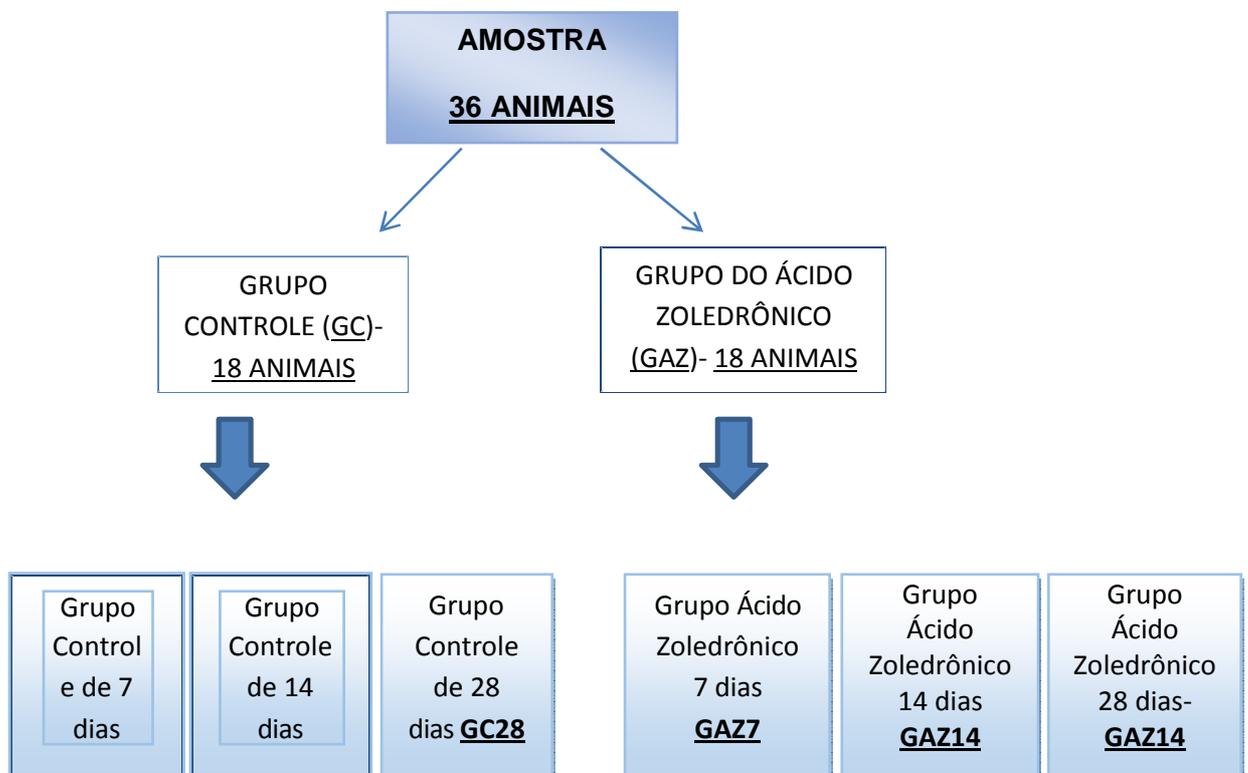
Todos os grupos foram submetidos a todas as etapas descritas anteriormente sendo que, no grupo do tratamento (GAZ), os animais receberam a aplicação de ácido zoledrônico (AZ), via intraperitoneal, 0,1 mg/kg de acordo com os estudos de Palacio et al. (2010).

No grupo controle (GC), foi administrada, por via intraperitoneal, 0,1 mg/kg solução fisiológica. Essa intervenção objetivou avaliar os efeitos do ácido zoledrônico sobre o processo de consolidação óssea em fraturas diafisárias de fêmures de ratos osteoporóticos submetidos à osteossíntese intramedular.

### 3.5.1 Distribuição e organização dos grupos do estudo

Os 36 (trinta e seis) animais foram distribuídos em dois grupos numericamente iguais: grupo controle (GC) e grupo do ácido zoledrônico (GAZ). Posteriormente, foram redistribuídos em três subgrupos de acordo com o período de consolidação óssea em 7, 14, 28 dias, com 6 (seis) animais em cada um desses subgrupos (Figura 4).

**Figura 4 - Distribuição dos animais nos grupo acima descritos, e os subgrupos com os correspondentes tempos de coleta.**



Fonte: Elaborada pela pesquisadora.

- Grupo Controle (GC): constituído de 18 (dezoito) ratos da raça Wistar que receberam aplicação de hidrocortisona por um período de 28 dias consecutivos com a finalidade de induzir a osteoporose. Posteriormente, no 29º dia os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico que consistia em uma incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito do animal. A patela foi deslocada medialmente, com a finalidade de localizar o intercôndilo do fêmur. Para encontrar a região do canal medular, utilizou-se um iniciador de Haste Intramedular, realizando, com ele, um orifício entre os

côndilos. Após a abordagem do canal medular, por via retrógrada, intercondiliana, foi introduzido um fio de Kirshner, até o fio ultrapassar o trocânter maior e exteriorizar-se na pele. Esse fio era deixado no canal medular, sendo utilizado como haste intramedular, bloqueado no trocânter maior, curvando a extremidade do fio de Kirshner, para evitar migração e sepultado abaixo da pele do animal. A patela era reduzida e a ferida cirúrgica suturada com fio de sutura Mononylon 5.0. Após o procedimento cirúrgico, era realizada a produção das fraturas. A técnica utilizada para a produção de fraturas foi à estabilização do fêmur do animal em uma guilhotina romba. Para uma correta posição do fêmur nessa depressão, o animal deve ser colocado na diagonal em relação à base da guilhotina romba, com a articulação do joelho em flexão e o quadril em rotação interna e a barra de aço, ao ser destravada, provoca a fratura na diáfise do fêmur. Após esses procedimentos, eram administrados, em dose única, via intraperitoneal, 0,1mg/Kg, de solução salina. Esses grupos foram subdivididos de acordo com o período de consolidação óssea em 7, 14, 28 dias com seis animais em cada um desses grupos. Respeitando o tempo determinado em cada subgrupo, os animais foram sacrificados e era realizada a dissecação do fêmur para a realização da análise radiológica e a avaliação histopatológica do tecido ósseo .

- Grupo Ácido Zoledrônico (GAZO): constituído de 18 ratos, que foram submetidos aos procedimentos descritos acima com exceção da aplicação da solução salina intraperitoneal. Após esses procedimentos, era administrado, via intraperitoneal, 0,1mg/Kg, do Ácido Zoledrônico, em dose única. Esses grupos foram subdivididos de acordo com o período de consolidação óssea em 7, 14, 28 dias com seis animais em cada um desses subgrupos. No período determinado em cada subgrupo, os animais foram sacrificados e era realizada a dissecação do fêmur para a realização da análise radiológica e a avaliação histopatológica do tecido ósseo.

### *3.5.2 Técnica anestésica*

Os animais foram pesados, para os cálculos da anestesia e dose do medicamento. Foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal

com cloridrato de xilazina (5mg/kg) e cloridrato de cetamina (40mg/kg), mantidos em plano anestésico satisfatório ao procedimento cirúrgico a ser realizado. A anestesia foi realizada no quadrante inferior esquerdo do abdômen. Efetuou-se a elevação da pele com uma das mãos e fez-se injeção com a perfuração da parede abdominal a 90°, garantindo o acesso à cavidade intraperitoneal sem o risco de lesão das vísceras. Obtido o nível anestésico adequado, os animais eram colocados na mesa operatória, em decúbito dorsal. A profundidade anestésica era avaliada por parâmetros clínicos, como a frequência respiratória e cardíaca, arritmias, movimentos das narinas e perda dos reflexos corneopalpebrais e de retirada da pata traseira contralateral ao estímulo doloroso por preensão.

### *3.5.3 Procedimento de preparação e administração das drogas*

Os grupos foram submetidos à corticoterapia (succinato sódico de hidrocortisona), nome comercial: Gliocort®. Apresentação: pó líofilo para solução injetável Gliocort 100mg: caixa com 50 frascos-ampola de vidro transparente. Apresenta composição: gliocort 100mg, Cada frasco-ampola contém 133,672mg de succinato sódico de hidrocortisona equivalente a 100mg de hidrocortisona base.

Foi administrada por 28 dias, via intramuscular, na região posterior da coxa esquerda, com seringa de 1 mL e agulha 13 x 0,45mm, com dosagem de 18 mg/Kg/dia, por um período de 28 dias para indução da osteoporose, de acordo com o estudo de Jamaru (2006).

O medicamento utilizado para o grupo do tratamento foi o ACLASTA® (ácido zoledrônico), 5 mg/100 mL- embalagens contendo 1 frasco de 100 mL de solução acondicionada em frascos plásticos, pronta para uso. Cada frasco com 100 mL de solução de Aclasta® contém 5 mg de ácido zoledrônico (anidro), equivalente a 5,330 mg de ácido zoledrônico monoidratado. Excipientes: manitol, citrato de sódio e água para injetáveis. Fabricado por Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça ou Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Áustria. Apresenta marca registrada de Novartis AG, Basileia, Suíça. Foi administrado por via intraperitoneal, 0,1mg/Kg. Esse

fármaco foi administrado ao final do procedimento cirúrgico, em dose única (PALACIO *et al.*, 2010).

A solução salina utilizada no estudo foi produzida pela Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza, CE), sendo administrado por via intraperitoneal, 0,1mg/Kg, dose única no grupo controle.

### **3.6 Procedimento cirúrgico**

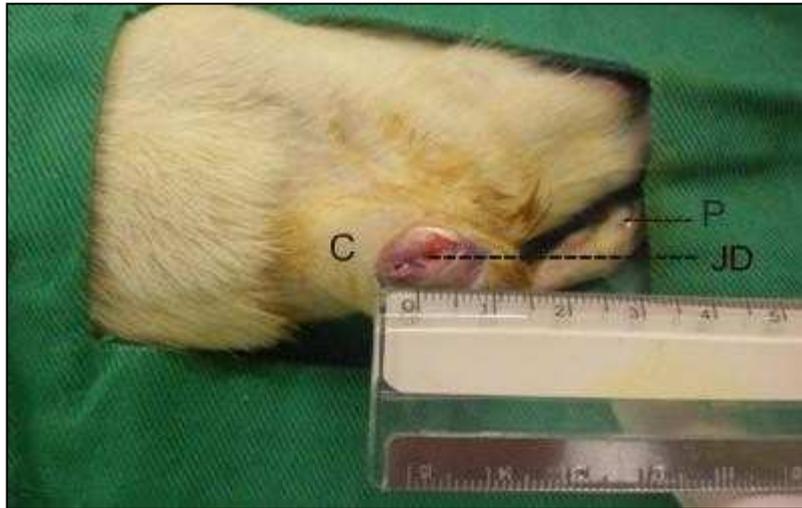
Tanto grupo do ácido zoledrônico (GAZ), bem como o grupo controle (GC) foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Todo o material utilizado na intervenção cirúrgica foi devidamente esterilizado e utilizado em apenas um animal por esterilização.

Os animais foram pesados, para os cálculos da anestesia e dose do medicamento. Para a anestesia foram utilizadas cloridrato de xilazina (5mg/kg) e o cloridrato de cetamina (40mg/kg) por via intraperitoneal. A anestesia foi realizada no quadrante inferior esquerdo do abdômen. Efetuou-se a elevação da pele com uma das mãos e fez-se injeção com a perfuração da parede abdominal a 90°, garantindo o acesso à cavidade intraperitoneal sem o risco de lesão das vísceras.

Após o estabelecimento de um nível anestésico apropriado, que poderia ser facilmente verificado ao se observar o animal imóvel ao manuseio, com ausência de resposta a estímulos nociceptivos e à manutenção de frequência e amplitude respiratória normal, foi realizada uma tricotomia na região anterior da articulação do joelho direito do animal com aparelho de barbear elétrico e, posteriormente, colocado em decúbito dorsal sobre mesas cirúrgicas, especialmente confeccionadas para animais de pequeno porte. Com Iodopovidona, foi realizada a antisepsia da área a ser submetida ao procedimento cirúrgico.

Foi realizada uma incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito do animal. A patela foi deslocada medialmente, com a finalidade de localizar o intercôndilo do fêmur. Para encontrar a região do canal medular, utilizou-se um iniciador de Haste Intramedular, realizando, com ele, um orifício entre os côndilos (Figura 5).

**Figura 5 – Incisão longitudinal anterior na articulação do joelho direito (JD) do animal e orifício de acesso ao canal medular entre os côndilos.**

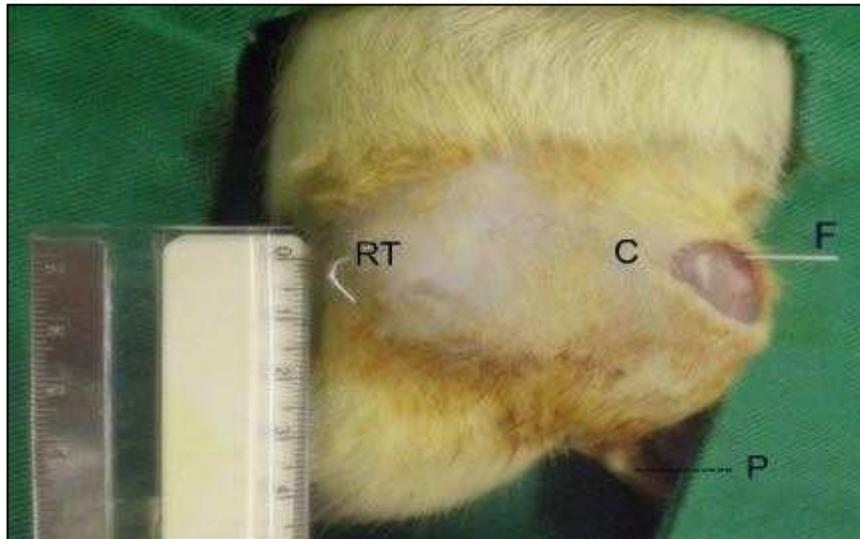


Fonte: Acervo da pesquisadora.

Obs.: Animal em decúbito dorsal, com joelho direito (JD) em flexão. Letras C e P correspondem, respectivamente, à coxa e à pata do animal.

Após a abordagem do canal medular, por via retrógrada, intercondiliana, foi introduzido um fio de Kirshner de 1mm de diâmetro com o auxílio de um motor de suspensão mini de 130W, velocidade de 0 a 18.000 rpm, até o fio ultrapassar o trocânter maior e exteriorizar-se na pele. Esse fio foi deixado no canal medular, sendo utilizado como haste intramedular, bloqueado no trocânter maior, curvando a extremidade do fio de Kirshner, para evitar migração (Figura 6) e sepultado abaixo da pele do animal. A patela foi reduzida e a ferida cirúrgica suturada com fio de sutura Mononylon 5.0.

**Figura 6 – Bloqueio do fio de Kirshner (F) na região trocanteriana (RT).**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

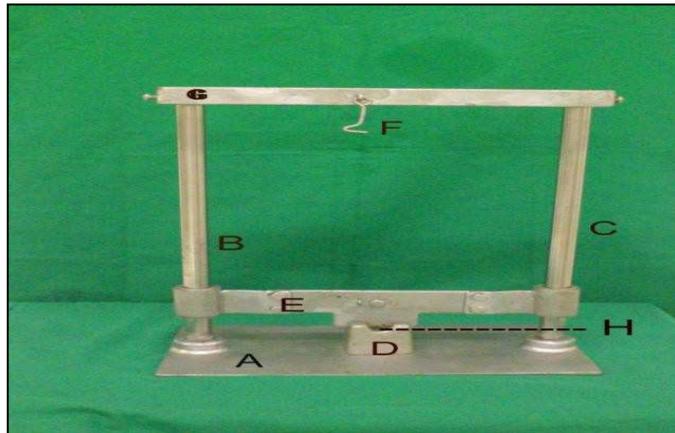
Obs.: Animal em decúbito lateral. Letras C e P correspondem, respectivamente, a coxa e pata do animal.

### **3.7 Técnica de indução da fratura**

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a produção das fraturas. A técnica utilizada para a produção de fraturas foi à estabilização do fêmur do animal em uma guilhotina romba, a que foi utilizada por Teixeira (2010), composta de uma base (A) com duas barras verticais e paralelas (B e C), e um dispositivo com quatro pontos (D) com duas depressões entre eles, uma para posicionar o fêmur do animal e outra para a superfície romba. Deslizando entre as barras verticais, há uma barra de aço com superfície romba (E), que fica travada (F) no platô (G), encontrado na outra extremidade de barras verticais, ligando-as. Quando a barra de aço é destravada do platô, ela cai com força de 5N, suficiente para fraturar a diáfise femoral (Figura 5).

Na figura 7, pode-se observar a barra de aço destravada, o que permite uma melhor visualização de tudo o que foi elucidado acima. A depressão (H) no dispositivo preso à base em que o fêmur do animal é estabilizado para ser submetido à fratura.

**Figura 7 - Ilustração da guilhotina romba.**

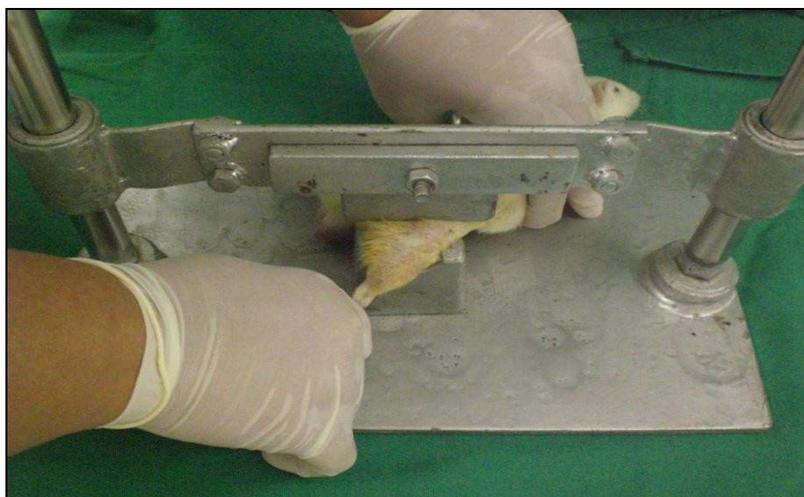


Fonte: Acervo da pesquisadora.

Obs.: Ilustração composta de uma base (A), duas barras verticais e paralelas (B e C), dispositivo com quatro pontos (D), com duas depressões entre eles (H), barra de aço com superfície romba (E), que fica travada (F) no platô (G). Quando é destravada, cai com força de 5N, suficiente para fraturar a diáfise femoral do animal.

Para uma correta posição do fêmur nessa depressão (Figura 7-H), o animal deve ser colocado na diagonal em relação à base da guilhotina romba, com a articulação do joelho em flexão e o quadril em rotação interna. Antes da barra de aço ser destravada, o pesquisador tem que ser cuidadoso, certificando-se de que a cauda do animal não seja exposta pela força que irá causar a fratura, situando-a ao longo do corpo do animal. O pesquisador segura o animal ainda anestesiado durante todo o processo da indução da fratura. Na figura 8, pode-se observar melhor o posicionamento do animal na guilhotina romba no momento da fratura.

**Figura 8 – Posicionamento do animal na guilhotina romba no momento da fratura.**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

No pós-operatório, os animais, de ambos os grupos, receberam Paracetamol (2mg/kg) associado a fosfato de codeína (0,03mg/kg) (CODEX®), diluído na água, por três dias.

Após o efeito da anestesia até o dia do sacrifício, os animais não foram imobilizados, deambulando livremente, conforme o membro submetido ao procedimento permitisse.

### **3.8 Estudo radiológico**

Após o sacrifício e dissecação dos fêmures dos animais de cada subgrupo, foi realizado o exame radiográfico. A aquisição das imagens radiográficas foi realizada no Núcleo de Excelência em Odontologia (NEXO) em Fortaleza, Ceará, por meio do equipamento Gnatus Raio X© (Equipamentos Médico-Odontológicos LTDA.) que possui as seguintes especificações: tensão do tubo de 70kVp, corrente do tubo de 70mA, tempo de exposição de 60 ms a 3,2 s, comprimento do cilindro de 200 mm, colimador retangular 30x40 mm, filtro equivalente em alumínio 1,5 mm, dimensão do foco do tubo 0,8 x 0,8, fator de resfriamento 1:30 segundos.

O tubo foi posicionado verticalmente e a peça anatômica colocada sobre um sensor a 15cm do foco de emissão (Figura 9). A peça anatômica foi posicionada com a face anterior voltada para cima, sendo o tempo de exposição de 0,32 segundos selecionado através de um controle digital, em que todas as funções do aparelho são comandadas (Figura10). O sensor estava conectado em um computador e as imagens obtidas eram visualizadas e digitalizadas no software Micro Imagem© (Figura 11).

**Figura 9 – Posicionamento vertical do tubo numa distância de 15 cm do sensor.**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

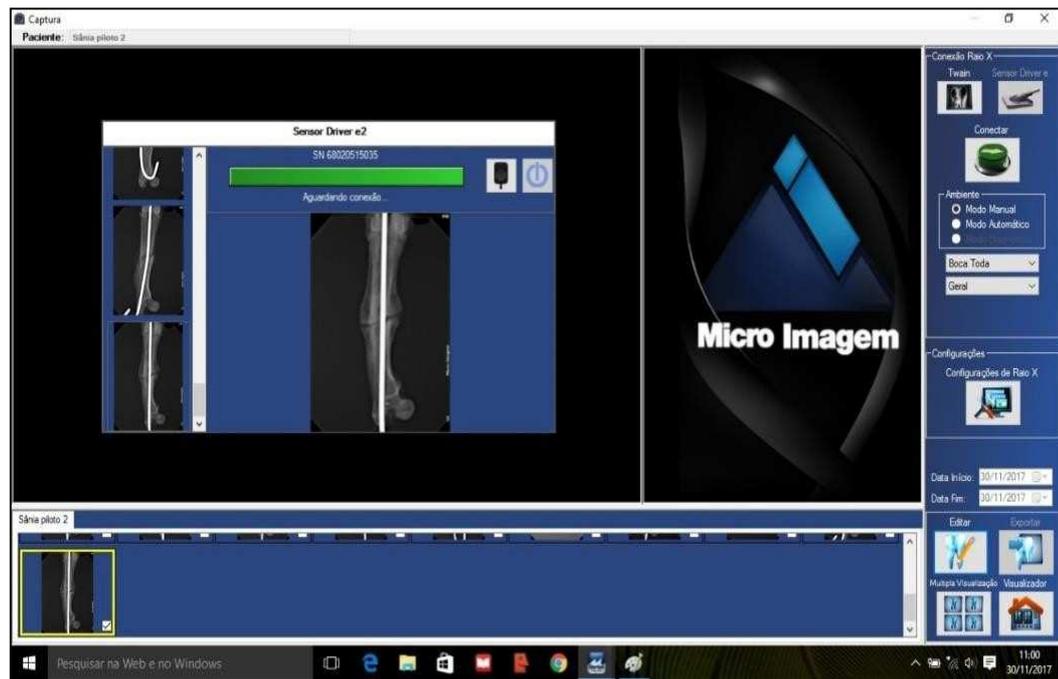
**Figura 10 - Controle do equipamento de Raio X demonstrando o tempo de 0,32 segundos utilizado para aquisição da imagem.**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Obs.: Todas as funções do aparelho são comandadas pelo controle digital, conectado com cabo espiralado de 5 metros.

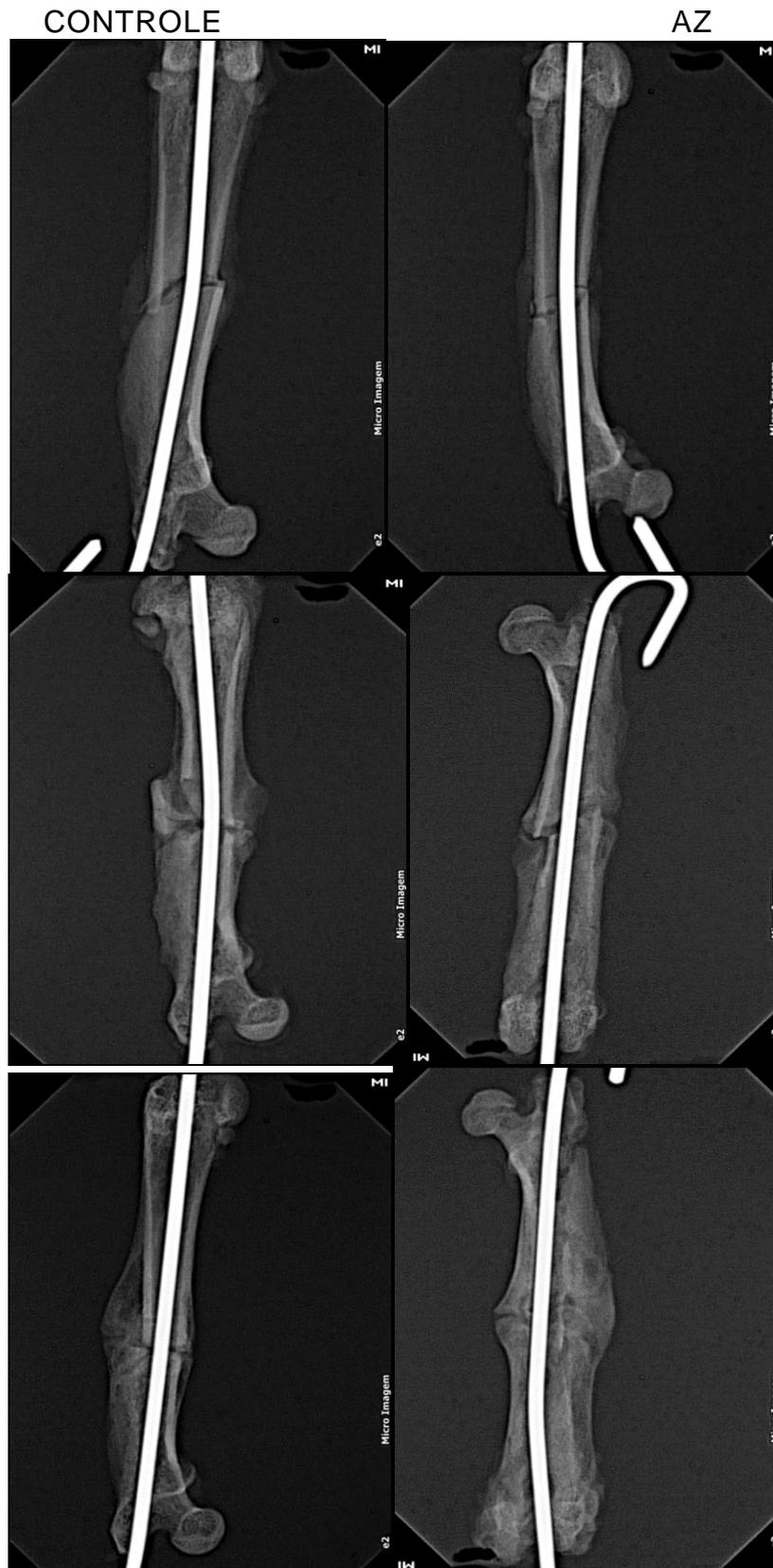
Figura 11 - Imagem radiológica capturada e digitalizada no *software* Micro Imagem®.



Fonte: Acervo da pesquisadora.

A figura 12 contém imagens radiográficas digitalizadas, ilustrando a diferença do calo ósseo entre os grupos controle e ácido zoledrônico nos tempos estudados, 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.

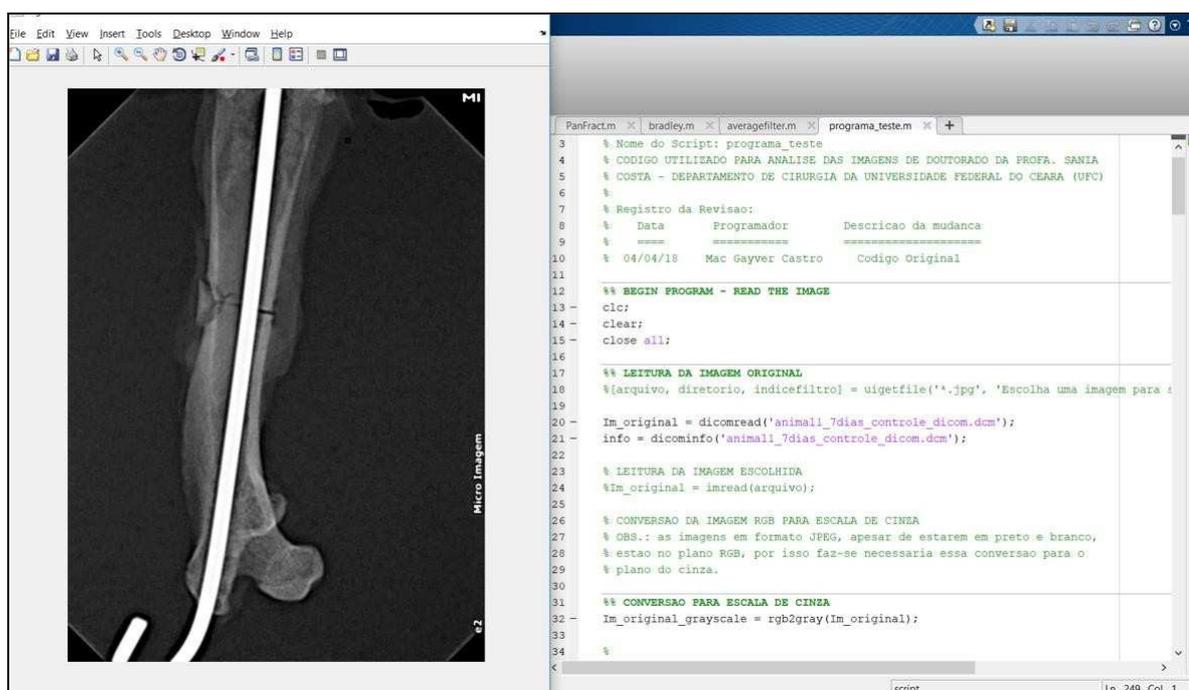
Figura 12 – Imagens radiográficas digitalizadas nos grupos, controle e ácido zoledrônico, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Após a digitalização das imagens radiográficas no software MicroImagem©, a área do calo ósseo (em mm<sup>2</sup>) foi quantificada. Um algoritmo baseado na descrição de White e Rudolph foi desenvolvido para obter informações morfológicas de cada imagem digitalizada. O algoritmo foi implementado em MATLAB (versão R2016a) e executa uma sequência de procedimentos de segmentação e operadores morfológicos na *Region of Interest* (ROI) de cada imagem. Inicialmente o programa lê a imagem e o operador (leia-se usuário) segmenta a região em que se encontra o calo ósseo (Figura 13). O software para a análise do calo ósseo foi desenvolvido de forma semelhante ao utilizado no estudo de Teixeira (2010).

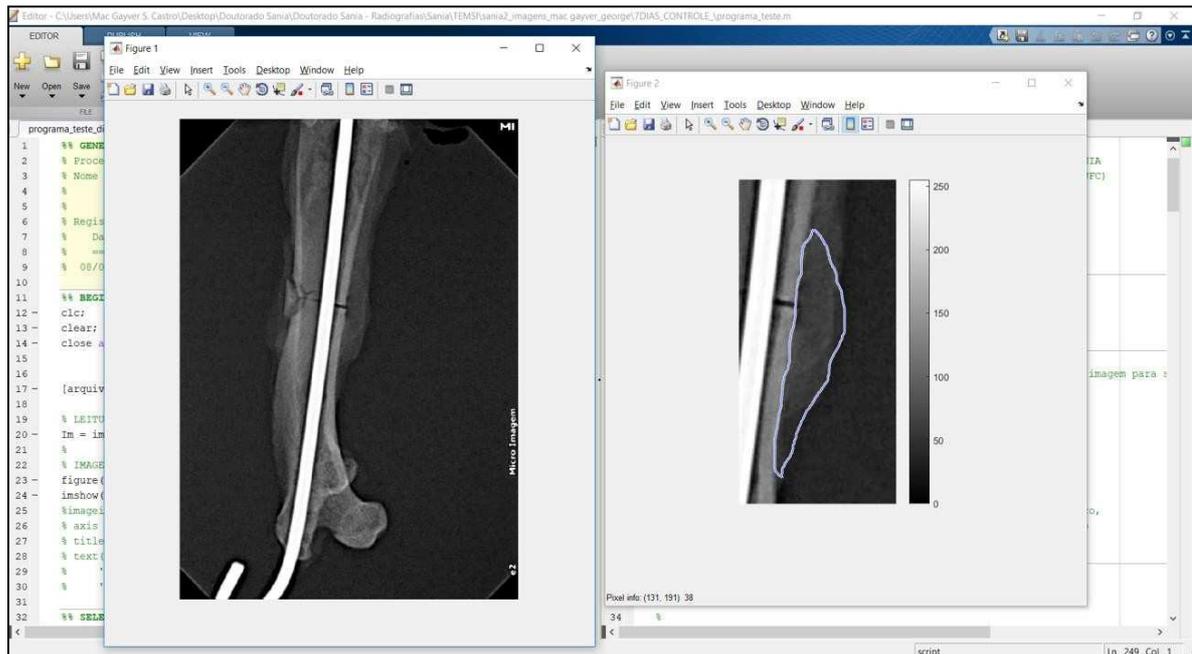
**Figura 13 - Leitura da imagem digital.**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Após a leitura da imagem original, o usuário contorna a região do calo ósseo à mão livre, executando outra segmentação (Figura 14).

Figura 14 - Contorno à mão livre da região que contém o calo ósseo..



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Obs.: Note-se também que, na janela do contorno, tem-se também informação sobre a localização e intensidade dos pixels

Após esse contorno, a última imagem segmentada é submetida a um filtro passa baixa por convolução do ROI com um filtro gaussiano. Isso foi feito para remover os artefatos normalmente encontrados em componentes espaciais de baixa frequência. Após esse procedimento, a imagem filtrada foi subtraída da imagem original e os elementos de alta frequência foram preservados. Após esses procedimentos, a imagem resultante da subtração foi binarizada (Figura 15) e a área do calo ósseo calculada, utilizando os valores do *Field of View* (FOV) no eixo-x, FOV no eixo-y, número de colunas e número de linhas na matriz da imagem digital. A área do calo ósseo foi calculada da seguinte maneira:

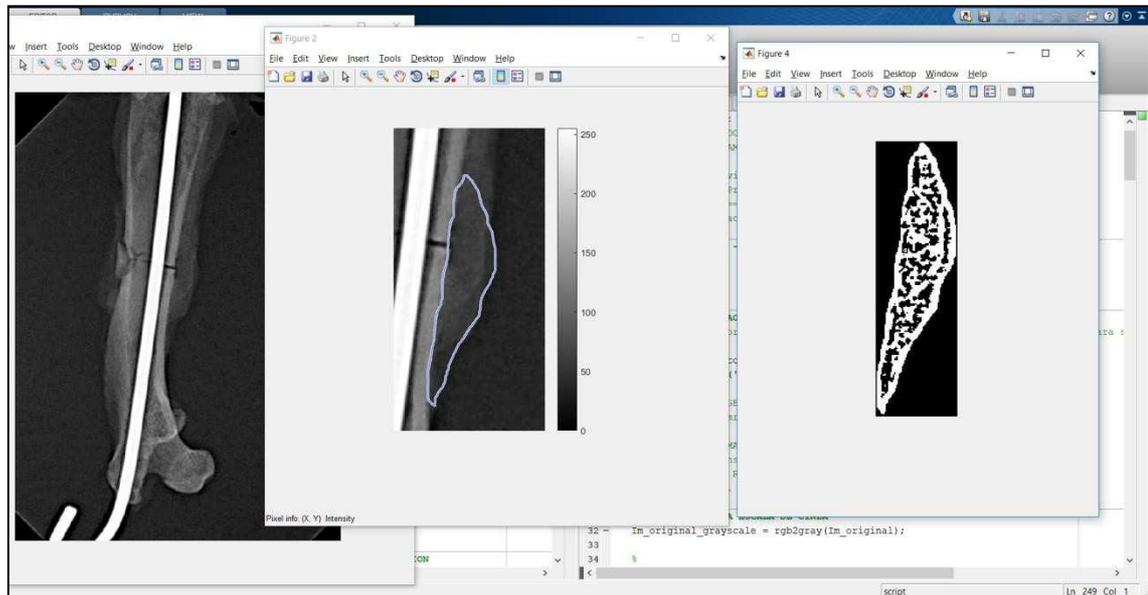
$$Area_{pixel} = \frac{FOV_x}{Colunas} + \frac{FOV_y}{Linhas} \quad (Eq. 1)$$

$$Area_{Calo} = P_B \cdot Area_{pixel} \quad (Eq. 2)$$

onde,  $FOV_x$  e  $FOV_y$  é o *Field of View* no eixo-x e eixo-y,  $Colunas$  é a quantidade de colunas presentes na matriz da imagem original,  $Linhas$

representa a quantidade de linhas na matriz da imagem original e  $P_B$  é a quantidade de pixels presente dentro do contorno binarizado (Figura 15).

**Figura 15 - Binarização da região do calo ósseo.**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Obs.: Importante ressaltar que área do calo ósseo foi calculada levando-se em consideração todos os pixels dentro do contorno da borda.

Como as imagens digitais foram adquiridas em formato DICOM, todas essas informações estavam contidas no Metadata, matriz que contém as informações específicas sobre o tamanho da imagem e dos pixels (Figura 16).

**Figura 16 - Janela mostra as informações de saída do programa desenvolvido para o cálculo da área do calo ósseo.**

```

MATLAB R2016a
HOME PLOTS APPS
New Script New Open Find Files Import Data Save Workspace Clear Workspace Analyze Code Run and Time Preferences Set Path Add-Ons Help Request Support
FILE VARIABLE CODE SIMULINK ENVIRONMENT RESOURCES
C:\Users\Mac Gayver S. Castro\Desktop\Doutorado Sania\Doutorado Sania - Radiografias\Sania\TEMSI\sania2_imagens_mac gayver_george\7DIAS_CONTROLE
Command Window
*ROI Area (RA) or Total Area (TA) = 6592.75 unidade de area
*Black Pixels (BP) = 8207
*White Pixels (WP) = 6577
*Black Pixels Skeletonized (BFSqIt) = 13540
*White Pixels Skeletonized (WFSqIt) = 1244
*Black Pixels Trabecular Image (BFTbIm) = 10501
*White Pixels Trabecular Image (WFTbIm) = 4283
*White Pixels Binarized Image (bw) = 6577
Valor da area contornada = 4 mm²
>> Info
info =
    filename: 'C:\Users\Mac Gayver S. Castro\Desktop\Doutorado Sania\Doutorado Sania - Radiografias\Sania\TEMSI\sania2_imagens_mac gayver_george\7DIAS_CONTROLE_\a...'
    fileSize: 1528836
    format: 'DICOM'
    formatVersion: 3
    width: 606
    height: 840
Current Folder
Name --
animat1_7dias_controle_dicom.dcm
animat1_7dias_controle_peg.jpg
animat1_7dias_controle_tiff.tif
animat2_7dias_controle_dicom.dcm
animat2_7dias_controle_peg.jpg
animat2_7dias_controle_tiff.tif
animat3_7dias_controle_dicom.dcm
animat3_7dias_controle_peg.jpg
Details

```

Fonte: Acervo da pesquisadora.

Obs.: No círculo vermelho, tem-se o valor da área contornado do calo, no círculo em azul, o formato da imagem original (DICOM) e, no círculo na cor preta, as informações sobre a quantidade de pixels no eixo-x e eixo-y.

### 3.9 Estudo histológico

O calo ósseo foi submetido a estudo microscópico em todas as peças. As peças foram submetidas à descalcificação com utilização de ácido fórmico a 5% por 72 horas. Após esse período, as peças foram cortadas longitudinalmente com lâmina de bisturi número 15 para selecionar apenas o calo ósseo e a região próxima à fratura. Os cortes foram desidratados, diafanizados, impregnados com parafina fundida, levados ao micrótomo, onde foi feito um corte de 5 micrômetros de espessura. As lâminas histológicas foram confeccionadas, utilizando-se a coloração *Picrosirius red* (MONTES; JUNGUEIRA, 1991).

Após desparafnização e reidratação, as lâminas foram coradas com *Picrosirius red* (Scytech®) por 45 minutos, lavadas rapidamente com ácido clorídrico 5% e passadas por água corrente. Após retirar o excesso de ácido, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris 5% por 45 segundos, lavadas, desidratadas e montadas com Entelam®. Após isso, as

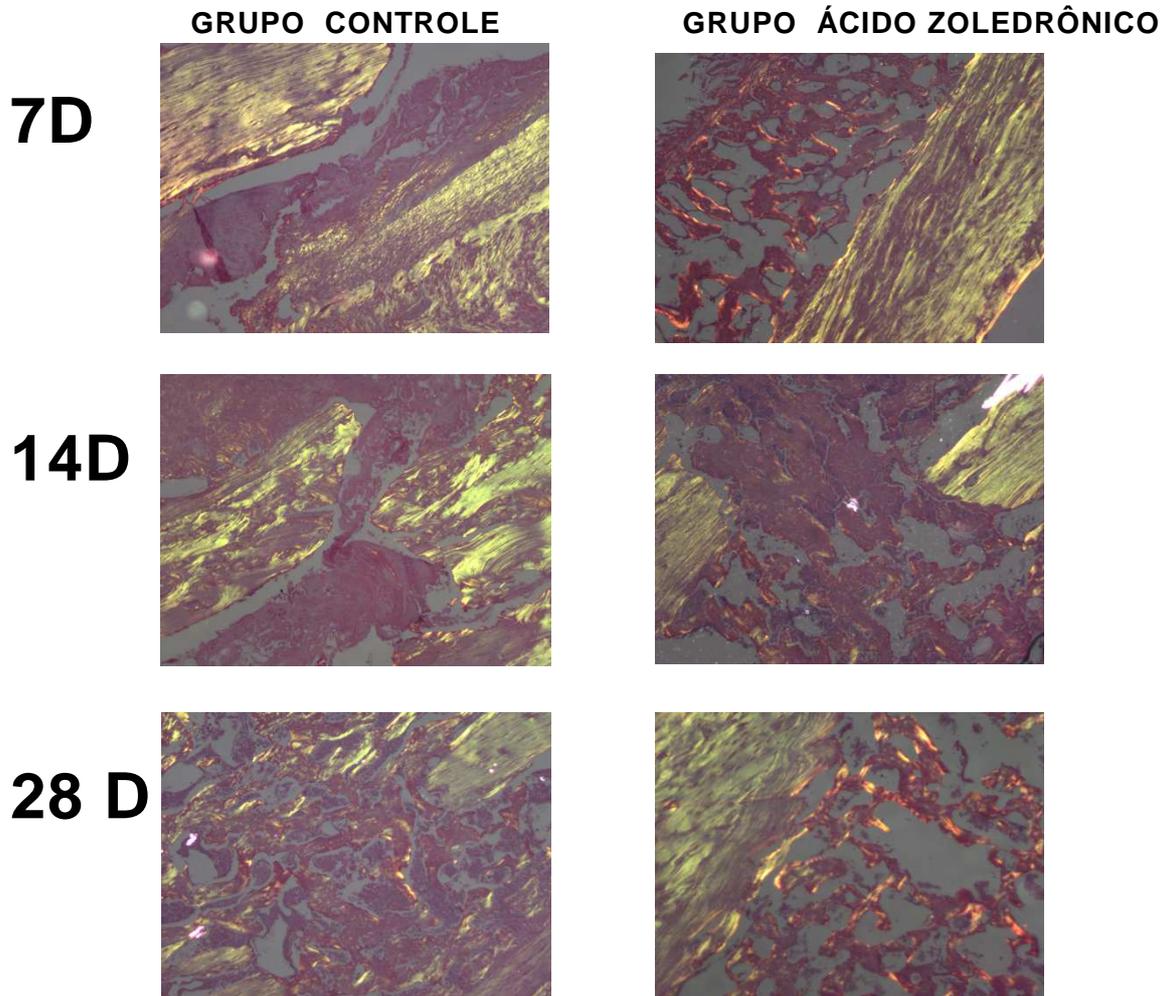
lâminas foram observadas na luz polarizada do microscópio óptico (Microscópio Motic BA310 com câmera acoplada Moticom 2000 2.0M Pixel USB 2.0 e programa Motic Plus 2.0.) para verificar a, birrefringência do colágeno tipo I e do colágeno tipo III no calo e na cortical próxima a fratura.

### *3.9.1 Análise digital e determinação do percentual de marcação*

As imagens foram capturadas (Cyber-shot DSC-W55, Sony), colocando as lâminas sob um microscópio óptico com luz polarizada (Microscópio Motic BA310 com câmera acoplada Moticom 2000 2.0M Pixel USB 2.0 e programa Motic Plus 2.0.). As configurações da câmera foram padronizadas, assim como a intensidade da luz do microscópio. As imagens digitais foram capturadas com uma magnificação de 100 vezes e armazenadas no formato *Windows*® BMP (Bitmap), com as dimensões de 450x450 *pixels*.

Os campos estudados corresponderam ao calo ósseo e às corticais do fêmur próximas à fratura. Sob a luz polarizada, as fibras do colágeno tipo I adquirem uma coloração entre o amarelo e o vermelho e as fibras do colágeno tipo III, uma coloração que varia entre o verde e o amarelo esverdeado (Figura 17).

Figura 17 – Imagens histológicas, ilustrando a diferença da densidade do colágeno tipo I e tipo III entre os grupos controle e ácido zoledrônico nos tempos estudados, 7, 14 e 28 dias de consolidação óssea.



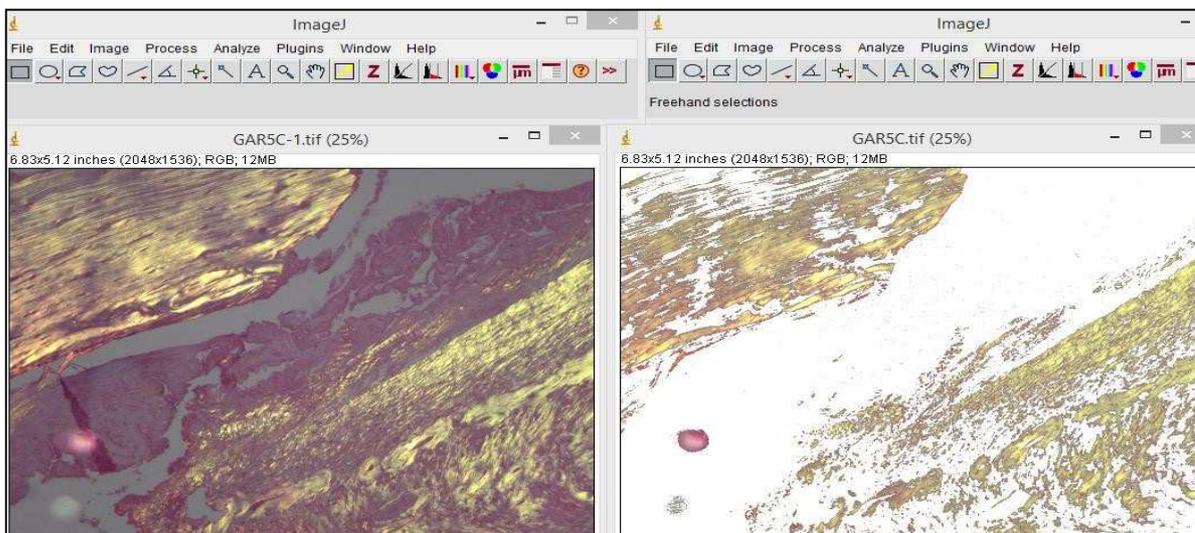
Fonte: Acervo da pesquisadora.

O exame quantitativo de colágeno foi realizado analisando as fotomicrografias utilizando-se um *software* de análise de imagem ImageJ após calibração das imagens pelo comando *Color Thershold* a função RGB para as cores Vermelho (mínimo de 71 e máximo de 255), Verde (mínimo de 0 e máximo de 69) e Azul (mínimo de 0 e máximo de 92). Depois da calibração, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits, binarizadas e mensurou-se a porcentagem de área de colágeno marcada (adaptado de ANDRADE et al., 2011).

Essas medidas foram obtidas por meio da diferença de coloração detectada pelo programa, que foi calibrado para identificar o espectro de

cores relativo ao colágeno tipo I e ao colágeno tipo III corados com *picrosirius red*. O programa separava automaticamente as estruturas de interesse e quantificava o percentual da estrutura de interesse em relação à área de interesse (Figura 18) (BRIZENO, 2013).

**Figura 18 – Ilustração do programa utilizado para quantificar a percentagem de colágeno tipo I e III, em lâminas com aumento de 100%.**



Fonte: Acervo da pesquisadora.

### 3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em forma de média e erro-padrão, submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn (dados não paramétricos) adotando uma confiança de 95%.

Comparações intergrupos (controle *versus* ácido zoledrônico), em cada tempo estudado, foram feitas mediante o uso do teste de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas).

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade  $\alpha$  do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05.

O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos, como para a elaboração dos gráficos.

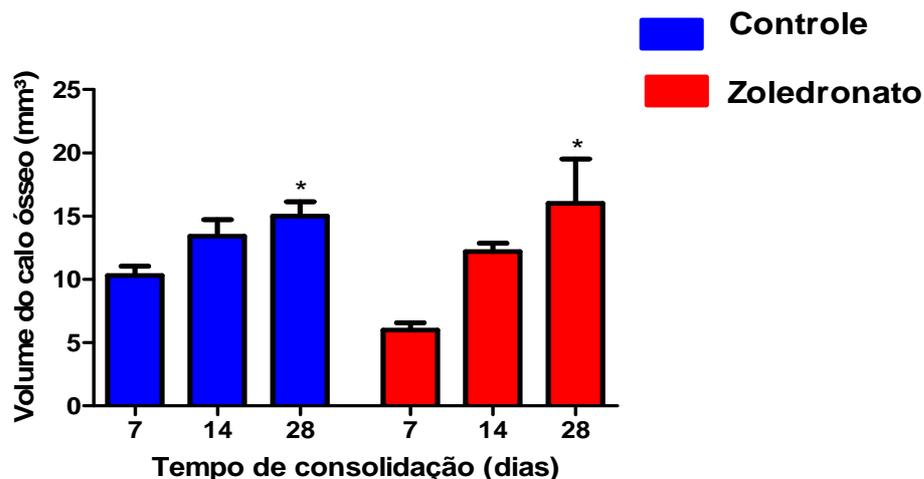
## 4 RESULT ADOS

### 4.1 Estudo radiográfico

A área do calo ósseo, mensurada nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea pode ser observada no Gráfico 1. Dados expressos como média e erro-padrão das medições efetuadas em fêmures de 6 (D7, D14) e 05 (D28) animais do grupo Controle e 3 (D7), 05 (D14) e 04 (D28) do grupo Ácido Zoledrônico (Tabela 1).

Na análise intergrupos, foram constatadas diferenças estatisticamente significante no grupo tratado com ácido zoledrônico (AZ). O grupo de 7 dias tratado com AZ foi significativamente inferior ao grupo controle ( $p=0,035$ ), sem diferença significativa entre esses dois grupos nos dias 14 ( $p=0,398$ ) e 28 ( $p=0,711$ ). Nas comparações dentro do mesmo grupo houve diferenças estatisticamente significantes tanto no grupo controle ( $p=0,020$ ) como o grupo Ácido Zoledrônico ( $p=0,037$ ). Ambos os grupos apresentaram aumento estatisticamente significativo do volume do calo ósseo no grupo de 28 dias.

**Gráfico 1 – Volume do calo ósseo mensurado nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. \* $p<0,05$  versus D7 do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis) (Média  $\pm$  EPM)**



Fonte: Dados da pesquisa.

**Tabela 1 – Valores da média e erro-padrão da média do volume do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).**

Tempo (dias)	Controle	Ácido Zoledrônico	Significância (intergrupos) <i>p-Valor</i> **
	Média±EPM	Média±EPM	
7	10,33 ± 0,71	6,00±0,58	p= 0,035
14	13,40 ± 1,33	12,20 ± 0,66	p= 0,398
28	15,00 ± 1,14*	16,00 ± 3,54*	p= 0,711
Significância (intragrupo) <i>p-Valor</i> *	p=0,020	p=0,037	

Fonte: Dados da pesquisa.

\*Teste de Kruskal-Wallis/Dunn;

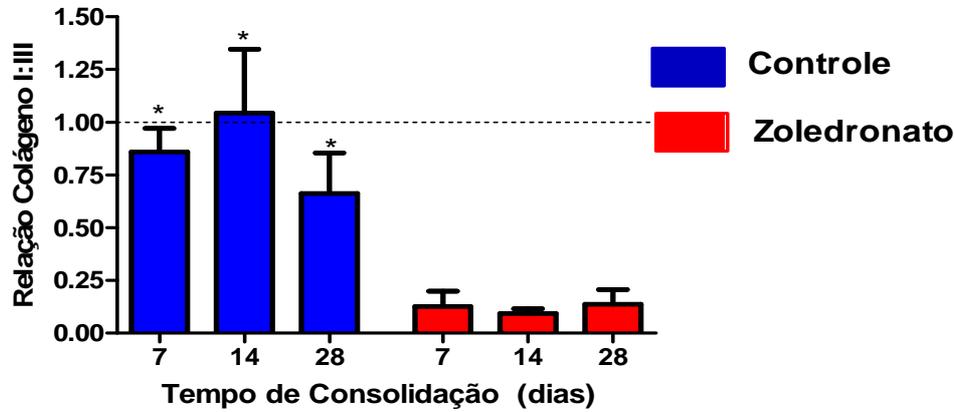
\*\*Teste de Mann-Whitney

#### 4.2 Estudo histológico: colágeno tipo I:III no calo ósseo

No Gráfico 2, pode-se observar o colágeno tipo I:III, mensurado na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e ao erro-padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de em fêmures de 6 (D7, D14) e 05 (D28) animais do grupo Controle e 3 (D7), 05 (D14) e 04 (D28) do grupo Ácido Zoledrônico (Tabela 2).

Na análise intergrupos, observou-se no grupo controle uma maior relação entre fibras de colágeno tipo I:III (Dia 7 (p=0,009), Dia 14 (p=0,016) e Dia 28 (p=0,016)). Já nas comparações dentro do mesmo grupo, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle (p=0,337) e o grupo Ácido Zoledrônico (p=0,850).

Gráfico 2 – Expressa a relação do colágeno tipo I:III, mensurado na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. \* $p < 0,05$  versus D7 do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis) (Média±EPM).



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 – Valores da média e erro-padrão da densidade de colágeno tipo I:III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).

Tempo (dias)	Controle	Ácido Zoledrônico	Significância (intergrupos) <i>p-Valor**</i>
	Média±EPM	Média±EPM	
7	0,85±0,11	0,12±0,07	$p=0,009$
14	1,04±0,30	0,09±0,02	$p=0,016$
28	0,66±0,19	0,14±0,07	$p=0,016$
<b>Significância (intragrupo) <i>p-Valor*</i></b>	$p=0,337$	$p=0,850$	

Fonte: Dados da pesquisa.

\* Teste de Kruskal-Wallis/Dunn;

\*\* Teste de Mann-Whitney

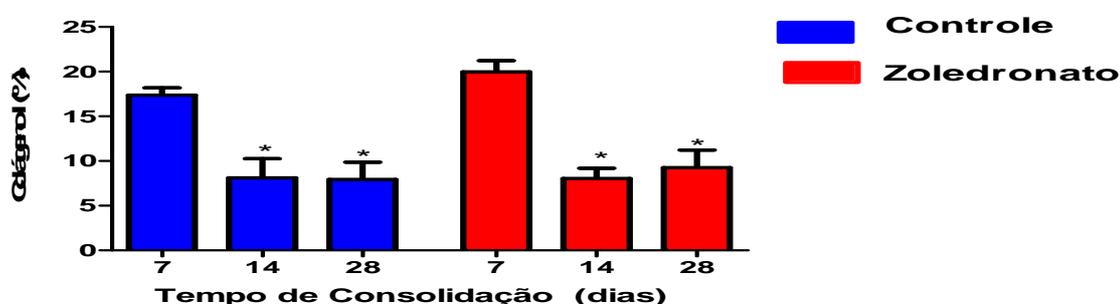
### 4.3 Estudo histológico: colágeno tipo I no calo ósseo

O Gráfico 3 expressa a densidade do colágeno tipo I, mensurado na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e ao erro-padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de em fêmures de 6 (D7, D14) e 05 (D28) animais do grupo Controle e 3 (D7), 05 (D14) e 04

(D28) do grupo Ácido Zoledrônico (Tabela 3).

Na análise intergrupos 7 dias ( $p=0,190$ ), 14 dias ( $p=0,901$ ) e 28 dias ( $p=0,548$ ) não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados. Todavia, nas comparações dentro nos mesmos grupos, constatou-se que a densidade de colágeno tipo I verificada no grupo controle ( $p=0,009$ ) e no grupo Ácido Zoledrônico ( $p=0,025$ ) houve redução significativa do dia 07 para o dia 14 e 28 tanto no grupo controle ( $p=0,009$ ) como no grupo Ácido Zoledrônico ( $p=0,025$ ).

Gráfico 3 – Expressa a densidade do colágeno tipo I, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. \* $p<0,05$  versus D7 do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis) (Média±EPM).



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3 – Valores da média e erro-padrão da densidade do colágeno tipo I na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).

Tempo (dias)	Controle	Ácido Zoledrônico	Significância (intergrupos) <i>p-Valor</i> **
	Média±EPM	Média±EPM	
7	17,36±0,79	19,95±1,25	$p= 0,190$
14	8,10±2,15*	8,02±1,13	$p= 0,901$
28	7,90±1,95*	9,26±1,95*	$p= 0,548$
<b>Significância (intragrupo) <i>p-Valor</i>*</b>	$p= 0,009$	$p= 0,025$	

Fonte: Dados da pesquisa.

\* Teste de Kruskal-Wallis/Dunn;

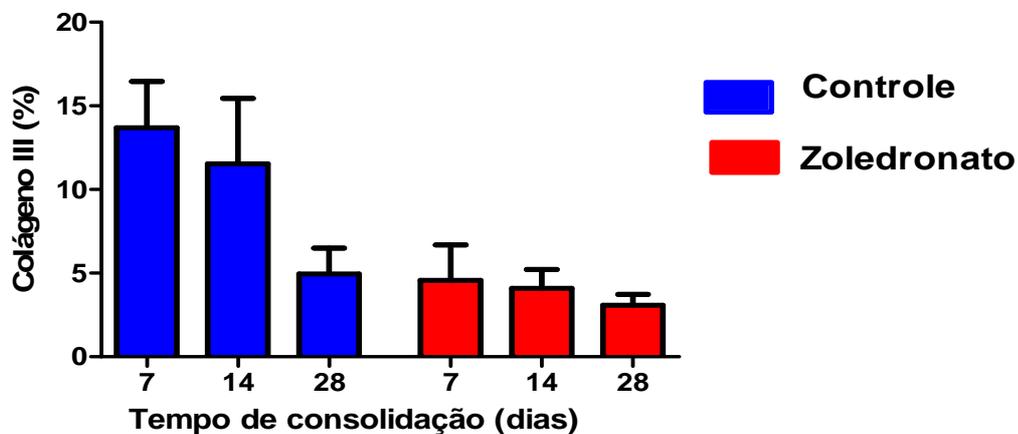
\*\*Teste de Mann-Whitney

#### 4.4. Estudo histológico: colágeno tipo III no calo ósseo

No Gráfico 4, pode-se observar o colágeno tipo III, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e ao erro-padrão das medições efetuadas em preparados histológicos em fêmures de 6 (D7, D14) e 05 (D28) animais do grupo Controle e 3 (D7), 05 (D14) e 04 (D28) do grupo Ácido Zoledrônico (Tabela 4).

Na análise intergrupos, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes mostrando uma menor quantidade de colágeno III no dia 7 ( $p=0,042$ ), sem diferença estatisticamente significantes nos dias 14 ( $p=0,151$ ) e 28 ( $p=0,402$ ). Nas comparações dentro do mesmo grupo, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle ( $p=0,107$ ) e o grupo Ácido Zoledrônico ( $p=0,824$ ).

**Gráfico 4 – Expressa a densidade do colágeno tipo III, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos dias 7, 14 e 28 de consolidação óssea. (Teste de Kruskal-Wallis) (Média±EPM).**



Fonte: Dados da pesquisa.

**Tabela 4 – Valores da média e erro-padrão do colágeno tipo III na porção medular do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ácido Zoledrônico nos três tempos estudados (dias 7, 14 e 28).**

Tempo (dias)	Controle	Ácido Zoledrônico	Significância (intergrupos) <i>p-Valor</i> **
	Média±EPM	Média±EPM	
7	13,68±2,77	4,57±2,11	p= 0,042
14	11,54±3,91	4,10±1,12	p= 0,151
28	4,96±1,53	3,08±0,64	p= 0,402
<b>Significância (intragrupo) <i>p-Valor</i>*</b>	p=0,107	p=0,824	

Fonte: Dados da pesquisa.

\* Teste de Kruskal-Wallis/Dunn;

\*\*Teste de Mann-Whitney.

## 5 DISCUSSÃO

Segundo o *Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, And Therapy* e o Consenso Brasileiro de Osteoporose, a osteoporose é um distúrbio osteometabólico e esquelético que apresenta, como características principais, o comprometimento da densidade mineral óssea, da resistência óssea, diminuição da força óssea e a qualidade do osso, que predispõe ao maior risco de fraturas, sendo, considerada uma pandemia, tamanha a sua incidência e prevalência (PALACIO et al., 2010; NGUYEN, et al., 2018).

No presente trabalho, foram produzidas fraturas em fêmur de ratos osteoporótico, aplicação da corticoterapia, em seguida foi realizada osteossíntese intramedular com fio de Kirshner de 1.0, e administrado o ácido zoledrônico nos diferentes tempos: 7, 14 e 28 dias com o objetivo de verificar a ação do ácido zoledrônico no processo de consolidação do osso fraturado. Para isso, foram realizadas análises radiológicas, em que se observou a área do calo ósseo, análises histológicas, onde se verificou a formação dos colágenos do tipo I e tipo III.

Pesquisas realizadas em ratos constituem um promissor recurso experimental por apresentarem semelhanças anatomofisiológicas com a espécie humana e relativa homogeneidade interespecie. O estudo experimental da consolidação de fraturas em modelos animais tem sido usado em diferentes espécies, assim como, diversos autores utilizam o rato em estudos relacionados à agressão ao tecido ósseo (RICO et al., 2000; MUNIZ; FARIA; VASCONCELOS, 2004).

Experimentos realizados com ratos apresentam as vantagens de ter uniformidade das amostras, no que se refere ao peso, ao estado de saúde, à alimentação, à idade e ao baixo índice de mortalidade, ciclo de vida curto, custos e manejos acessíveis e características ósseas biomecânicas similares às do ser humano (MAINARDES et al, 2007; KUPCZIK et al., 2009; TEIXEIRA, 2010).

O uso dos ratos da raça *Wistar, Rattus norvegicus albinus*, no presente estudo foi motivado por estas vantagens além de que vários artigos

científicos têm usado este animal para estudar a consolidação de fraturas proporcionando possíveis comparações. Optou-se pelo sexo masculino por não haver variações hormonais em relação às fêmeas (GUARNIERO *et al.*, 2007; KUPCZIK *et al.*, 2009).

Nos procedimentos cirúrgicos e induções das fraturas nos fêmures foi utilizado anestesia com cloridrato de cetamina (40mg/kg), e cloridrato de xilazina (5mg/kg), e por apresentar facilidade de obtenção desses fármacos e por não haver necessidade de se utilizar grandes volumes dos mesmos. Dos protocolos mais comumente empregados, a associação xilazina-cetamina é considerada uma das mais populares técnicas anestésicas utilizadas em pequenos animais. A xilazina é capaz de contrabalancear os efeitos indesejáveis inerentes ao uso da cetamina, como o aumento da atividade motora e a ativação simpática. Apresenta propriedades seletivas clássicas, como relaxamento muscular por ação central, sedação e analgesia (LUNA *et al.*, 2000; SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2002; HALL; CLARKE, 2003).

A cetamina tem como principal função promover anestesia em humanos e animais. Promove perda sensorial marcante e analgesia, assim como amnésia e paralisia do movimento, sem perda real da consciência. A anestesia mostrou-se segura, pois somente um animal morreu durante o procedimento cirúrgico do grupo controle 28 dias, é eficaz para a realização dos procedimentos cirúrgicos e a indução das fraturas foi realizada sem sofrimento adicional para os animais (LUFT; MENDES, 2005; THURMON; TRANQUILLI; BENSON, 2007).

A via de administração escolhida foi a intraperitoneal, por ser amplamente empregada nesse tipo de animal, o procedimento anestésico mostrou-se bastante eficaz. No pós-operatório, a analgesia foi obtida com a utilização da codeína (derivado morfínico) em associação com o paracetamol diluído em água potável, semelhante à utilizada por Mesquita *et al.* (2010).

Os animais deambulavam desde o primeiro dia de pós-operatório sem restrições. Em relação a via de administração do ácido zoledrônico utilizou-se a via intraperitoneal na dose de 0,1mg/kg semelhante à utilizada por Palacio *et al.*, (2010).

A escolha da via intraperitoneal tornou-se mais viável para a pesquisa pelo fato de que esse medicamento possui alto custo e, depois de aberto, só tem validade de apenas 24 horas, se armazenado em refrigerador entre 2° a 8°C. Para a realização das cirurgias foi feita uma programação detalhada, em que vários fatores foram estruturados, como a verificação do horário de funcionamento do laboratório, a disponibilidade dos funcionários, a obtenção de todo o material cirúrgico necessário. Além da otimização do tempo para a esterilização do instrumental cirúrgico, com o objetivo de realizar o máximo de cirurgias possíveis dentro do tempo de validade do medicamento.

No presente estudo foi realizado o modelo de osteoporose experimental utilizando gliocort 100mg (succinato sódico de hidrocortisona) equivalente a 100mg de hidrocortisona base, por um período de 28 dias, via intramuscular, na região posterior da coxa esquerda. Este modelo experimental foi instituído com base no estudo realizado por Jamacaru (2006) que teve por objetivo avaliar o processo de desmineralização óssea induzida por corticóide durante 28 dias em ratos.

Neste estudo os animais foram divididos em dois grupos de 32 animais: o grupo controle (aplicado solução fisiológica) e o grupo hidrocortisona (HIDRO). Os ratos do grupo HIDRO foi submetido à corticoterapia diária, via intramuscular com dosagem de 18 mg/kg/dia, por um período de 7, 14, 21 e 28 dias. Os animais foram sacrificados com 7, 14, 21 e 28 dias de tratamento conforme seus subgrupos, os fêmures direitos e esquerdos foram dissecados e limpos.

As imagens da região óssea de interesse foram capturadas de forma padronizada utilizando microscópio cirúrgico equipado com câmera de vídeo e utilizou o programa SAMOS que realizou o processamento das imagens obtendo o cálculo do número de trabéculas ósseas, número de bifurcações e da área trabecular. Para a obtenção da densidade óptica radiográfica (DOR) a imagem digital foi obtida com o programa Digora, sendo a DOR mensurada no terço médio do fêmur.

Este estudo teve como resultados: o número de trabéculas mensurado no grupo hidrocortisona foi significativamente maior ( $P=0,0497$ )

que o observado no grupo controle, somente no dia 28 para o fêmur direito. No esquerdo houve o mesmo comportamento sendo ( $P=0,0384$ ).

Para o número de bifurcações, no grupo HIDRO foi significativamente maior ( $P=0,0498$ ) que o observado no controle apenas no dia 28 para o fêmur direito; já para o esquerdo o aumento no grupo HIDRO também foi significante ( $P=0,0440$ ). No tocante à área trabecular óssea, houve uma redução significativa nos fêmures direito e esquerdo no grupo HIDRO, sendo para o lado direito ( $P=0,0408$ ) e ( $P=0,0429$ ) nos dias 21 e 28 respectivamente; e para o esquerdo ( $P=0,0401$ ) e ( $P=0,0451$ ) nos dias 21 e 28 respectivamente.

Quanto à DOR verificou-se uma redução significativa no grupo HIDRO em relação ao controle, com ( $P=0,0002$ ) para o membro direito no dia 21, redução também observada no grupo HIDRO com ( $P < 0,0001$ ) no dia 28. Tais dados demonstraram que o modelo experimental utilizado e o sistema desenvolvido constitui um método de quantificação do processo de alteração do padrão trabecular, assim como, na análise estrutural do osso, constatou perda óssea, fato consubstanciado pela DOR. A partir desse estudo, comprovou-se que após aplicação da hidrocortisona por um período de 28 dias em ratos ocorre a indução de osteoporose, justificando-se, portanto, a escolha do período de 28 dias de aplicação da hidrocortisona para a indução da osteoporose no presente estudo.

Este modelo tem como características ser fácil exeqüibilidade e, por conseguinte, reprodutibilidade, e que, além disso, permite a comparação entre a dinâmica da perda óssea induzida pelo corticóide entre o mesmo grupo (intragrupo) e entre grupos diferentes (intergrupos). Tal intento foi conseguido pela indução de perda óssea em fêmur de rato mediante a administração diária de 18mg/kg/dia de hidrocortisona, resultando em diminuição da densidade óssea constatada pelos parâmetros morfométricos e pela densitometria óptica radiográfica (JAMACARU 2006).

O uso do corticoide para induzir perda óssea constitui um modelo de osteoporose de fácil reprodução. Modelos em coelhos com osteoporose induzida por corticóide são amplamente encontrados na literatura (KIMMEL,1996).

Estudos realizados por Saville (1969) são pioneiros na utilização de ratas ooforectomizadas, para o estudo da osteoporose, observando menor quantidade de cálcio por unidade de volume do osso.

Além das semelhanças musculoesqueléticas, o rato possui grande semelhança com relação ao ciclo hormonal humano, passando também pelo período de menopausa e apresentando alterações fisiológicas semelhantes (THOMPSON; SKINNER; PIERCY, 1994).

A osteoporose induzida por corticóides já se têm seus mecanismos fisiopatológicos conhecidos. Os corticóides inibem diretamente a atividade dos osteoblastos, diminuindo a formação óssea. Além disso, ocorre à inibição da absorção do cálcio no intestino, os corticóides atuam ainda na secreção de hormônio paratireoideo, que por sua vez age sobre os osteoclastos para aumentar a reabsorção óssea. Por apresentar estas características é possível que o uso da hidrocortisona tenha interferido diretamente no processo de consolidação óssea (SCHIMMER; PARKER, 2006).

A osteoporose por ser uma doença multifatorial requer também estudos em várias vertentes; nesse sentido, os modelos de osteoporose induzida por corticóides, sejam em coelho ou em rato, são de importância fundamental, visto que, simulam situações clínicas onde a perda de massa óssea é causada por drogas esteroidais.

Pesquisas realizadas por Jee e Yao (2001) correlacionaram a administração de glicocorticóides com a perda óssea. Prova convincente de que o rato é capaz de reproduzir com precisão a perda óssea induzida por glicocorticóides.

Perilli *et al.* (2010) observaram que fêmeas de ratas da linhagem Sprague- Dowley evoluem com osteoporose sistêmica, detectável aos exames microtomográficos, duas semanas após o procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral.

Para realização da fratura foi confeccionado um aparelho de fraturas em que o principio de funcionamento assemelha-se aos já bem documentados por Bonnarens e Einhorn (1984); Vialle *et al.* (2004), Teixeira (2010) e Cavalcante (2011) em que uma lâmina romba atinge a área a ser

fraturada após percorrer em queda livre uma determinada altura e através de uma flexão de três pontos é criada a fratura.

Os aparelhos propostos por Bonnarens e Einhorn (1984) e por Vialle *et al.* (2004) utilizavam peso de 500g e o utilizado no presente trabalho, a barra de aço deslizante que contem a lâmina romba, pesa 746g. Utilizaram os animais em posição supina com o quadril abduzido e o impacto da guilhotina romba ocorreu na face medial da coxa. O correto posicionamento do animal no canaleta transversa da plataforma foi crucial para localizar a fratura no fêmur. Após realização de disseções em coxas de ratos optamos pelo impacto lateral da lâmina romba na coxa do animal, pois é na face medial que percorre os grandes vasos e nervos da coxa e em uma situação de trauma poderia ocorrer uma grande desvascularização e comprometer desta forma a consolidação da fratura.

Estudo realizados por Bonnarens e Einhorn (1984) utilizando a guilhotina romba demonstraram que a simplicidade do modelo, a facilidade de sua utilização e o grau mínimo de traumatismo, envolvendo os tecidos moles, tornam-no uma excelente técnica para a produção de modelos de fraturas fechadas em pesquisas com animais.

Foi realizada uma incisão longitudinal anterior de aproximadamente 2 cm na articulação do joelho do animal, com a finalidade de inserir o fio de Kirshner de 1 mm de diâmetro no canal medular do fêmur, por via retrógrada, uma vez que esse modelo foi escolhido por se aproximar das hastas intramedulares utilizadas em humanos.

A mesma técnica foi realizada por Teixeira (2010). Pode-se observar, em outros trabalhos, o uso desta mesma técnica como, por exemplo, por Kupczik *et al.* (2009), numa pesquisa que avaliou o uso do ultra som pulsado de baixa intensidade na consolidação óssea.

Historicamente, têm-se desenvolvido métodos de tratamento cirúrgico, baseados nos conceitos de fixação biológica das fraturas que orientam o menor manuseio do invólucro do fêmur com o intuito de preservar a sua vascularização e conseqüente melhor capacidade de consolidação óssea (TEIXEIRA, 2010).

Em estudo comparativo de haste intramedular e a placa ponte para o tratamento das fraturas multifragmentárias do fêmur de 119 pacientes, mostrou que esses métodos de osteossíntese são eficientes com bons e excelentes resultados clínicos, alto índice de consolidação das fraturas e baixos índices de complicações (FERNANDES, *et al.*, 2002).

A consolidação da fratura é um evento complexo que envolve a interação de uma variedade de diferentes processos. (SCHENDELER *et al.*, 2008).

Os dias de escolha para o sacrifício dos animais foram baseados no trabalho de Udupa e Prasad (1963). Realizaram estudos químicos e histoquímicos dos constituintes orgânicos no reparo de fraturas e úmero em ratos durante seis semanas e no trabalho de Rocha e Ribeiro (2003), em que se estudou o processo de consolidação óssea (avaliação radiológica e histológica) de fraturas de tíbia de ratos tratados com acetaminofen.

Esses autores definiram quatro fases no processo de consolidação das fraturas em ratos, em que na primeira semana, tem-se a fase fibroblástica, na segunda, a fase colágena, na terceira e quarta, a fase osteogênica e, na quinta e sexta, a fase de remodelação correspondente à quinta e sexta semanas, quando o excesso de massa óssea formada é reabsorvido (MÜLLER *et al.*, 2004; SILVA, 2016).

Pacientes com osteoporose, principalmente a primária do tipo I (pós-climatério), que apresentam uma alta atividade osteoclástica, podem beneficiar-se deste bisfosfonato de 3ª geração, simplesmente mantendo sua massa óssea trabecular (RIGGS; MELTON, 1986; BRANKIN; MITCHELL; MUNRO, 2005).

A primária, que é a forma mais comum, é diagnosticada na ausência de doenças ou está relacionada a outras condições que levem à diminuição da massa óssea e a secundária é diagnosticada quando a diminuição de massa óssea é atribuída a outra doença ou está relacionada ao uso de medicamentos. Alguns medicamentos podem estar associados à osteoporose secundária, muitos dos quais são utilizados para o tratamento dos agravos associados. Eles são os glicocorticoides, anticonvulsivantes

agentes imunossupressores, anticoagulantes, agentes hormonais e anti-hormonais (LASH *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Dinçel *et al.* (2008) demonstraram que pacientes idosos são acometidos por fraturas no fêmur proximal por quedas da própria altura em ossos osteoporóticos e recomenda-se como tratamento da osteoporose, especialmente com os bifosfonatos, para que tais fraturas sejam evitadas.

O fármaco escolhido para a realização do estudo foi o ácido zoledrônico (AZ) foi administrado em dose única por via intraperitoneal, 0,1mg/Kg, de acordo com os estudos de Palacio *et al.* (2010), por ser um novo e poderoso bifosfonato.

Os bifosfonatos apresentam como mecanismo de ação a formação de um análogo da adenosina trifosfato osteoclástica, que induz a apoptose e a inibição da via do mevalonato na síntese de colesterol por inativação da farnesil difosfato sintase, com consequente desregulação do transporte intracelular, desorganização citoesquelética e inibição da proliferação osteoclástica (WOO *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Amanat *et al.* (2007), avaliaram qual o tempo certo de uma dose única do ácido zoledrônico necessário para aumentar a força no reparo de fraturas em ratos. Utilizaram, na pesquisa, 125 ratos, divididos em cinco grupos: grupo controle, grupo que recebeu o ácido zoledrônico no local da fratura (0,01 mg/ kg) e grupo que recebeu o ácido por via intravenosa (0,1 mg/kg), com diferentes horários de administração: no momento da fratura, uma semana após a fratura e duas semanas após a fratura. Os animais foram sacrificados seis semanas após a cirurgia. E foram feitas análises radiográficas, histológicas, testes biomecânicos, tomografia computadorizada quantitativa. É importante ressaltar que foi realizado nessa pesquisa uma fratura fechada de fêmur; utilizaram um fio, para ser usado como haste intramedular e também fizeram uso de uma guilhotina romba. Concluíram que o tempo de uma dose única intravenosa do ácido zoledrônico desempenha um papel importante na modulação das propriedades do calo e ainda observaram que o atraso da dose única produz um calo maior e mais forte.

Os bifosfonatos são geralmente bem tolerados, com uma baixa incidência de efeitos adversos. As complicações associadas à terapêutica com bifosfonatos incluem, entre outras, a osteonecrose dos maxilares (maxila e/ou mandíbula) e fraturas atípicas do fêmur, sendo importante uma avaliação do benefício-risco desta classe farmacológica, assim como, do seu perfil de segurança no tratamento de longa duração, para um melhor esclarecimento desta preocupação emergente. O osso do tipo trabecular é o principal sítio de ação da droga, que parece manter a espessura e a densidade de suas trabéculas, aumentando, por conseguinte, a resistência às fraturas (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005; WALTER *et al.*, 2007; KHOSLA *et al.*, 2012).

A maioria dos BF, de uso oral, tem efeitos bastante satisfatórios no tratamento de doenças com altos índices de remodelação óssea, contudo, seus efeitos adversos acabam por diminuir, em larga escala, a adesão dos pacientes a tais tratamentos.

Cramer *et al.* (2007) apresentam taxas de adesão dos pacientes, aos tratamentos com bisfosfonatos orais, que variam de 17,9% a 78%.

Um dos principais efeitos adversos relatados, principalmente em relação àqueles de uso oral, é o desconforto gastrointestinal que provocam, geralmente associado à queixas de pirose intensa, diarreia, vômitos, cefaleia e obstipação; sintomas como os de gripe e edema periférico, além de efeitos mais graves como hepato-toxicidade, peritonite e óbito. Dados esses confirmado durante a realização dos experimentos, pois tivemos o óbito no grupo do ácido zoledrônico de 3 animais no grupo de 7D, 1 no grupo de 14D e 2 animais no grupo de 28 dias demonstrando que o uso do corticoide juntamente com o ácido zoledrônico acarreta danos (ETTINGER *et al.*, 1999; NEER *et al.*, 2001; YANIK; TURKAY; ATALAR, 2007).

Um dos grandes problemas da toxicidade direta nos elementos celulares são os eventos pró-inflamatórios. Em estudos *in vitro* com culturas de macrófagos, tem sido observado que a incubação com diferentes concentrações de AZ é capaz de ativar a óxido-nítrico sintase induzida (iNOS) de forma concentração-dependente. A ativação ocorre por uma via dependente do Fator Nuclear kappa B (NF-κB) e da consequente expressão

de Interleucina(IL)-1 $\beta$ , Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-6 (MURATSU *et al.*, 2013).

O AZ destaca-se por sua ação antitumoral, antiangiogênica e possui excelentes resultados na redução de atraso da morbidade esquelética e das complicações decorrentes da doença óssea metastática, sendo, por conseguinte, utilizado, por mais de 15 anos, em pacientes com metástases ósseas de tumores sólidos. É utilizado no tratamento da hipercalemia de malignidade, na osteoporose pós menopausa, osteoporose induzida por corticóide e doença de Paget (CLÉZARDIN, 2005; GRIZ; COLARES; BANDEIRA 2006; AAPRO *et al.*, 2008; SILVA, 2016).

Estudos realizados por Riggs e Melton (1986) demonstraram que pacientes com osteoporose, principalmente a primária do tipo I (pós-climatério), que apresentam uma alta atividade osteoclástica, podem beneficiar-se deste bisfosfonato de 3ª geração, simplesmente mantendo sua massa óssea trabecular

Pesquisa realizadas em pacientes com doença de Paget demonstraram que pacientes que receberam sucessivos tratamentos com vários tipos de bifosfonatos apresentaram respostas inadequadas ao tratamento, ao passo que a administração de uma única dose de 5 mg de ácido zoledrônico apresentou ser mais eficaz. O ácido zoledrônico (Aclasta®) um bisfosfonato contendo azoto de terceira geração, é o primeiro tratamento a ser aprovado uma vez por ano para doentes com osteoporose pós-menopáusia ou com elevado risco de fratura (TUCCI, 2008).

Estudos demonstram que 5mg do ácido zoledrônico uma vez ao ano é eficaz na redução do risco de vários tipos de fraturas em pacientes com osteoporose pós-menopausa ou fraturas recentes de baixo trauma. Além disso, também são observadas, em geral, melhorias na densidade mineral óssea (DMO) e reduções nos marcadores de turnover ósseo (DEEKS; PERRY, 2008).

De acordo com estudos realizados por Greenspan *et al.* (2015) que tinha como objetivo determinar a eficácia e segurança do ácido zoledrônico no tratamento da osteoporose em mulheres idosas institucionalizadas. No

estudo foram incluídas 181 mulheres de 65 anos ou mais de idade com osteoporose, inclusive aquelas com comprometimento cognitivo, imobilidade e multimorbidade que estavam vivendo em asilos e instituições com cuidados assistidos. Foi realizada uma dose de 5 mg de ácido zoledrônico ou placebo, por via intravenosa, e suplementação diária com cálcio e vitamina D e foram feitas medidas da densidade mineral óssea (DMO) da coluna e do quadril (BMD) por período de 12 e 24 meses e observados os eventos adversos. Concluiu-se que neste grupo de mulheres idosas com osteoporose, uma dose de ácido zoledrônico melhorou a DMO e reduziu o turnover ósseo em mais de dois anos.

Estudos realizados sobre os efeitos da terapia com ácido zoledrônico em 14 pacientes com doença de Paget e idade entre 54 e 90 anos. Observou que os níveis séricos de fosfatase alcalina (ALP) eram elevados em pelo menos 40% acima da faixa de referência normal e as taxas de filtração glomerular (GFRs) eram  $\geq 40$  mL / minuto. Após Injectar o ácido zoledrônico (ZA) (5 mg) durante 15 minutos. Colheram a ALP e a urina N-telopéptido / creatinina (NTx / Cr) antes da terapia e aos 3, 6, 9 e 12 meses e, posteriormente, em intervalos de 4 meses, que a terapia com ZA induziu remissões em 13/14 pacientes e induziu remissões mais prolongadas em pacientes que anteriormente tinham remissões  $\leq 12$  meses. A falta de remissão em 1 paciente apesar de 2 cursos de terapia é evidência de um desafio terapêutico contínuo para alguns pacientes com uma forma mais resistente de doença de Paget (TUCCI, 2008).

Os bisfosfonatos são potentes inibidores da reabsorção óssea. Estes tipos de fármacos, que são utilizados para o tratamento de doenças osteolíticas, têm sido associados à ocorrência de osteonecrose oral, especialmente em doentes com mais de 60 anos de idade. Estudos atuais demonstraram que os efeitos citotóxicos dos bifosfonatos nos osteoblastos desempenham um papel importante no desenvolvimento da osteonecrose oral (BASSO *et al.*, 2013).

Khajuria *et al.*, (2015) demonstraram que a terapia combinada com ácido zoledrônico (ZOL) e alfacalcidol (ALF) é mais eficaz em reduzir a porosidade do osso do que a monoterapia com um dos fármacos

administrado isoladamente em ratos submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD). No que diz respeito à melhoria da resistência mecânica da diáfise femoral média, o tratamento combinado com ZOL mais ALF foi mais eficaz do que a monoterapia comum dos fármacos administrado isoladamente. Além disso, a terapia combinada com ZOL mais ALF foi mais eficaz na melhoria do peso seco e das cinzas do osso do que a monoterapia com ZOL ou ALF em ratos submetidos à IPTD.

Para a análise histológica e para avaliar a formação de colágeno, foram confeccionadas lâminas utilizando-se a coloração *Picrosirius red*. Após esse procedimento, as lâminas foram observadas na luz polarizada do microscópio óptico e posterior análise no programa Motic Plus 2.0 para verificar a birrefringência do colágeno tipo I e do colágeno tipo III no calo ósseo da fratura (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; ANDRADE *et al.*, 2011).

O programa seleciona área de interesse e o próprio programa fez a contagem automática da área por número de pixel (a área tratada é comparada com a área não tratada (que é definida como controle de 100% de neoformação óssea), adjacente à área tratada, com comprimento e larguras similares à da área tratada analisada da mesma lâmina histológica (BRIZENO, 2013).

Também se pode observar estudos com o objetivo de quantificar a deposição do colágeno em trabalhos de Teixeira (2010) em seus estudos envolvendo queimaduras de pele em animais. Os tecidos ficam luminosos mediante a luz polarizada sobre um fundo escuro o que permite diferenciar o colágeno tipo I do colágeno tipo III.

Sob a luz polarizada, as fibras do colágeno tipo I com fibras grossas e alinhadas adquirem uma coloração entre o amarelo e o vermelho e as fibras do colágeno tipo III, com fibras finas e dispersas e uma coloração que varia entre o verde e o amarelo esverdeado (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; BRIZENO, 2013).

Embora a maioria dos estudos utilize a análise radiológica e histológica na avaliação dos fármacos na consolidação óssea em modelos experimentais em ratos, alguns utilizam outros meios de avaliação destes

efeitos, distintos dos utilizados neste estudo, tais como avaliação clínica e análise biomecânica (GIORDANO, *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 2004).

Para a análise radiológica existe a microtomografia computadorizada (microTC) que pode alcançar uma resolução na imagem de até 1.000.000 de vezes maior que a da tomografia computadorizada e pode ser considerada o padrão-ouro para avaliação de pequenos animais (Bl *et al.*, 2010; TREISTER *et al.*, 2010; AGHALOO *et al.*, 2011).

No que se refere à área do calo ósseo, pode-se observar que na análise intergrupos diferenças estatisticamente significantes no grupo tratado com Ácido Zoledrônico (AZ) foram observadas no grupo de 7 dias sendo significativamente inferior ao grupo controle ( $p=0,035$ ), e não apresentou diferenças estatisticamente significante nos grupos dos 14 dias ( $p=0,398$ ) e 28 ( $p=0,711$ ). Nas comparações dentro do mesmo grupo, foram observadas diferenças estatisticamente significantes tanto no grupo controle ( $p=0,020$ ) como no grupo do Ácido Zoledrônico ( $p=0,037$ ) também apresentaram redução significativa do volume do calo ósseo do dia 7 para o dia 28 (Gráfico 1; Tabela 1). Ao final da dissecação e nos exames radiograficos foi perceptível que o osso encontrava-se mais forte, sugerindo um aumento da densidade mineral ossea, principalmente no grupo de 28 dias.

Adams e Hamblen (1994) descrevem que no quinto estágio das fraturas, que ocorre no final da consolidação óssea, o calo ósseo aumenta de tamanho, formando anel bulboso ao redor no foco de fratura. Os resultados encontrados estão de acordo com esta descrição, em que o calo ósseo no tempo de 28 dias é maior que o observado nos demais tempos, tanto para o grupo ácido zoledrônico quanto para o grupo controle.

Estudos realizados por Perilli *et al.* (2010) demonstrou que houve diferença estatística entre os animais que fizeram uso do ácido zoledrônico (OAZ), pois, apresentaram densidade óssea maior que aqueles que fizeram uso de água destilada (SAD), independentemente do procedimento cirúrgico realizado ou do momento da eutanásia. Sabe-se que a privação hormonal provoca um estímulo negativo progressivo sobre o sistema osteoblástico (*feedback* negativo), fazendo com que o sistema osteoclástico torne-se facilitado, fatos que, invariavelmente, culminam em desmineralização óssea.

Foi observado neste estudo, que o ácido zoledrônico, bloqueia a organização do citoesqueleto e motilidade dos osteoclastos, parece ter promovido a proteção do tecido ósseo, mantendo a densidade femoral nos animais que fizeram uso da droga.

Pereira *et al.* (2009), realizaram estudo com o ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas, utilizaram em seu estudo 40 ratas (*rattus novergicus albinus*) e administração intraperitoneal do zoledronato de 0,1 mg/Kg. Realizaram estudos clínicos, biomecânicos e histomorfométricos e concluíram que o zoledronato não teve influência significativa na massa corpórea e que não houve aumento significativo da resistência óssea na diáfise tibial ou área trabecular óssea.

Estudo histoquímico, realizado por Udupa e Prasad (1963) com o objetivo de caracterizar a evolução das fases de consolidação óssea em ratos em período de seis semanas.

A primeira fase fibroblástica, que é caracterizada principalmente pela proliferação de fibroblastos oriundos do perióstio e posteriormente de condroblastos e osteoblastos; fase do colágeno, na qual, à medida que diminui a proliferação celular, ocorre produção de fibras colágenas no espaço entre os fragmentos; fase osteogênica, caracterizada pela proliferação e hipertrofia de condroblastos, os quais são substituídos por osteoblastos que produzem nova substância intercelular e osso novo e a fase de remodelação, correspondente à quinta e sexta semanas, quando o excesso de massa óssea formada é reabsorvido (MÜLLER *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Adams e Hambleton (1994) descrevem que, no final da consolidação óssea, o calo ósseo aumenta de tamanho formando um anel bulboso ao redor do foco da fratura.

Matos, Araújo e Paixão (2007), utilizando coelhos usaram amostra composta por trinta animais, submetidos à osteotomia na diáfise proximal da fíbula. Dividiram os animais em dois grupos: grupo experimento, em que foi aplicada dose única de 0,04 mg/Kg de zoledronato e o grupo controle. Os animais foram sacrificados após uma, duas e quatro semana. Foram realizadas análises histomorfométricas. Concluíram que o zoledronato é

caracterizado por acentuado estímulo na formação óssea na área metafisária da fíbula, resultando em grande quantidade de volume ósseo trabecular.

Já na análise da densidade de colágeno tipo I:III no calo ósseo observou-se que na análise intergrupos, no grupo controle uma maior relação entre fibras de colágeno tipo I:III (Dia 7 ( $p=0,009$ ), Dia 14 ( $p=0,016$ ) e Dia 28 ( $p=0,016$ )). Já nas comparações dentro do mesmo grupo, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle ( $p=0,337$ ) e o grupo do Ácido Zoledrônico ( $p=0,850$ ). (Gráfico 2; Tabela 2).

O colágeno é sintetizado pelos fibroblastos. Nos adultos essas células são observadas em menor frequência, pois suas divisões de mitoses são reduzidas. Entram em mitose apenas por conta de uma solicitação aumentada, seja ela por sobrecarga funcional ou em resposta as lesões. Apesar dos fibroblastos serem capazes de sintetizar e secretar vários componentes da matriz extracelular, a síntese da molécula de colágeno tipo I é a mais bem estudada, principalmente devido a sua grande abundância e ampla distribuição em vários locais do organismo (RODRIGUES, 2009).

É uma proteína fibrosa caracterizada por grande diversidade biológica e ampla força de tensão. Esta diversidade na sua estrutura e função pode ser observada nas diferentes formas de ocorrência do colágeno. Nos tendões as fibras encontram-se entrelaçadas formando camadas flexíveis na pele, na córnea formam películas transparentes de fibras finas, também pode funcionar como lubrificantes de cartilagem das articulações, nos ossos na forma de colágeno mineralizado, entre outros (DUARTE, 2011).

Os colágenos do tipo I, II e III são os mais abundantes do organismo. O tipo I está presente na pele, tendão e osso; o tipo II, em cartilagem e humor vítreo; e o tipo III, em pele e músculos (SANTIN, 2014).

Assim como os demais tecidos conjuntivos, o tecido ósseo é formado por células e uma matriz extracelular, sendo esta última constituída por matéria orgânica e inorgânica, extremamente importante para o metabolismo ósseo, além de conferir rigidez e resistência a impactos, o que é essencial para manter a integridade deste tecido (VIGUET-CARRIN;

GARNERO; DELMAS, 2006; SANTIN, 2014).

A matéria inorgânica do osso se apresenta na forma de sais minerais de hidroxiapatita fosfatada e carbonatada, enquanto o colágeno é considerado o principal componente orgânico da matriz óssea (ROSS; PAWLINA, 2008; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Em geral o colágeno contém cerca de 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e carregados. A glicina, prolina e a alanina são aminoácidos alifáticos e a lisina é um aminoácido com características básicas (PRESTES, 2013).

A maior parte do colágeno do tecido ósseo é do tipo I, e em menor quantidade tem-se o colágeno do tipo V. O primeiro tipo de colágeno (I) apresenta-se como um importante componente da matriz óssea, auxiliando na formação dos cristais de apatita e conferindo suporte estrutural, flexibilidade e resistência para o osso neorformado, já o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos (ROSS; PAWLINA, 2008; COUDROY *et al.*, 2015).

O colágeno tipo I é o principal produto de secreção do osteoblasto, célula responsável pela síntese da matriz óssea orgânica. Cerca de 90% da matriz extracelular óssea é constituída por colágeno tipo I, e os 10% restantes por proteínas não colágenas, como a osteocalcina, osteonectina e outras como alguns fatores de crescimento (COUDROY *et al.*, 2015).

Em relação ao colágeno tipo I no calo ósseo nos dias: 07( $p=0,190$ ), 14: ( $p=0,901$ ) e 28: ( $p=0,548$ ), (Gráfico 3; Tabela 3) não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados.

Estudos realizados por Teixeira (2010) que tinha por objetivo verificar os efeitos do carbonato de lodenafil no processo de consolidação óssea nos fêmures de ratos reduzidos com fio de Kirshner, observou-se que a densidade de colágeno tipo I diminuiu de forma relativa no tempo de 14 dias de consolidação em relação aos demais tempos estudados no calo ósseo. Na região cortical próxima a fratura, também houve um decréscimo da densidade do colágeno tipo I no tempo de 14 dias de consolidação óssea, comparado ao

tempo de 7 dias.

De acordo com os estudos realizados por Udupa e Prasad (1963) que afirmaram que o conteúdo mucopolissacarídeo aumenta rapidamente na primeira semana após a lesão, e é seguido por um aumento do conteúdo de colágeno durante a segunda semana. A deposição de fosfato de cálcio durante a terceira e à quarta semana provoca uma queda aparente no teor de colágeno, no decurso desse período. O conteúdo de colágeno tende a voltar ao normal durante a fase de remodelação, que só ocorre na quinta e sexta semanas. Todavia, nas comparações dentro nos mesmos grupos, constatou-se que a densidade de colágeno tipo I verificada no grupo controle ( $p=0,009$ ) e no grupo Ácido Zoledrônico ( $p=0,025$ ) houve redução significativa do dia 07 para o dia 14 e 28 tanto no grupo controle ( $p=0,009$ ) como no grupo ácido zoledrônico ( $p=0,025$ ).

Já a função dos osteoclastos é a de reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado. Isto ocorre em locais que estão mecanicamente enfraquecidos, podendo desenvolver microfraturas (EASTELL *et al.*, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Em circunstâncias normais, os osteoclastos secretam ácidos que dissolvem o mineral ósseo e enzimas proteolíticas que degradam a matriz óssea. A reabsorção dos ossos pelos osteoclastos é seguida pela migração dos osteoblastos para o local onde está havendo a reabsorção, resultando na formação de novo tecido ósseo. O mecanismo de ação do ácido zoledrônico é justamente inibir a reabsorção óssea, mediada pelos osteoclastos (SIRIS *et al.*, 2006).

Em relação à densidade de colágeno tipo III no calo ósseo foi verificada nas análises intergrupos diferenças significantes mostrando uma menor quantidade de colágeno III no dia 7 ( $p=0,042$ ), e sem diferença estatisticamente significantes nos dias 14 ( $p=0,151$ ) e 28 ( $p=0,402$ ). Nas comparações dentro do mesmo grupo, também não foram constatadas diferenças significantes entre os grupos Controle ( $p=0,107$ ) e o grupo Ácido Zoledrônico ( $p=0,824$ ). (Gráfico 4; Tabela 4).

Estudos realizados por Teixeira (2010) observou que a densidade do colágeno tipo III aumentou no grupo controle no tempo de 14 dias de consolidação óssea em relação aos demais tempos estudados dentro do mesmo grupo, tanto no calo ósseo quanto na região cortical próxima a fratura, em acordo com o descrito por Udupas e Prasad (1963).

O colágeno do tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão, vasos sanguíneos, abundando no tecido conjuntivo frouxo, é encontrado nos músculos dos intestinos, fígado e no útero. Constitui as fibras reticulares (BARASCUK *et al.*, 2011; COUDROY *et al.*, 2015).

É necessário a realização de outros estudos que possam interferir na evolução do processo de consolidação óssea, utilizando grupos de animais não osteoporóticos para melhor entendimento da ação do ácido zoledrônico e da interferência da hidrocortisona no processo de consolidação óssea, pois já se têm o conhecimento que os processos de remodelação óssea podem ser regulados por diversas vias, como a via RANK-RANKL-OPG tem sido uma das mais bem descritas. A interação RANK-RANKL favorece a osteoclastogênese com consequente reabsorção óssea e a via de sinalização Wnt (GRAVES; OATES; GARLET, 2011; EI-KHASSAWNA *et al.*, 2017; JOENG, 2017; CUI *et al.*, 2018).

Desta forma, destaca-se a importância de mais estudos experimentais com a utilização do ácido zoledrônico em ratos não osteoporóticos e osteoporóticos, e estudos clínicos no sentido de evidenciar e caracterizar novos mecanismos que elucidem a ação do ácido zoledrônico no processo de consolidação de fratura de fêmur.

## 6 CONCLUSÃO

O ácido zoledrônico promoveu um aumento na formação no calo ósseo nos ratos osteoporóticos no grupo do ácido zoledrônico no tempo de 28 dias (intragrupos). Em relação ao colágeno do tipo III houve uma redução deste tipo de colágeno no grupo do AZ (intergrupos). Na análise do colágeno do tipo I não houve diferenças estatisticamente significante nos grupos.

## REFERÊNCIAS

- AAPRO, M., ABRAHAMSSON, P. A., BODY, J. J., COLEMAN, R. E., COLOMER, R., COSTA, L., CRINO, L., DIRIX, L., GNANT, M., GRALOW, J., HADJI, P., HORTOBAGYI, G. N., JONAT, W., LIPTON, A., MONNIER, A., PATERSON, A. H. G., RIZZOLI, R., SAAD, F., THURLIMANN, B. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumors: recommendations of an international expert panel. **Annals of Oncology**, v.19, n.3, p.420-432, 2008.
- ADAMS, J.C.; HAMBLEM, D.L. **Manual de fraturas, incluindo lesões articulares**. 10.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1994.
- AGHALOO, T.; KANG, B.; SUNG, E.; SHOFF, M.; RONCONI, M.; GOTCHER, J.E.; BEZOUGLAIA, O.; DRY, S.M.; TETRADIS, S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.26, n.8, p.1871- 1882, Aug. 2011.
- ALVES, C.; ROBAZZI, T.C.V.; MENDONÇA, M. Retirada da corticoterapia: recomendações para a prática clínica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.84 n.3, p.192-202, May/June 2008.
- AMANAT, N.; McDONALD, M.; GODFREY, C.; BILSTON, L.; LITTLE, D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.22, n.6, p.867-876, Jun. 2007.
- ANDRADE, T.A. M.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N.T.; GARCIA, S.B.; COUTINHO-NETTO, J.; JORDÃO JÚNIOR, A.A.; FRADE, M.A. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.44, n.10, p.1036-1047, oct. 2011.
- ARAUJO, .D.V.; BAHIA, L.R.; SOUZA, C.P.R.; FERNANDES, R.A.; NAVARRO, J.; BUENO, R.L.P. Análise do custo-efetividade do ácido zoledrônico na prevenção da fratura osteoporótica proximal de fêmur no cenário do Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.11, n.3, p.357-368, 2008.
- BANDEIRA, F.; CARVALHO, E. F. Prevalência de osteoporose e fraturas vertebrais em mulheres na pós-menopausa atendidas em serviços de referência. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.10, n.1, p.86-98, mar. 2007.
- BARASCUK, N.; VEIDAL, S.S.; LARSEN, L.; LARSEN, D.V.; LARSEN, M.R.; WANG, J.; ZHENG, Q.; XING, R.; CAO, Y.; RASMUSSEN, L.M.; KARSDAL, M.A. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. **Clinical Biochemistry**, v.43, n.10-11, p.899–904, Jul. 2010.

- BASSO, F.G.; SILVEIRA TURRIONI, A.P.; HEBLING, J.; SOUZA COSTA, C.A. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology**, v.59, n.6, p.534-541, 2013.
- BELTRÃO, K.I.; CAMARANO, A.A.; KANSO, S. **Dinâmica populacional brasileira na virada do século XX**. Rio de Janeiro: IPEA, 2004. (Texto para Discussão, 1.034).
- BI, Y.; GAO, Y.; EHIRCHIOU, D.; CAO, C.; KIKUIRI, T.; LE, A.; SHI, S.; ZHANG, L. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jawlike disease in mice. **The American Journal of Pathology**, v.177, n.1, p.280-290, Jul. 2010.
- BLACK, D.M.; DELMAS, P.D.; EASTELL, R.; REID, I.R.; BOONEN, S.; CAULEY, J.A.; COSMAN, F.; LAKATOS, P.; LEUNG, P.C.; MAN, Z.; MAUTALEN, C.; MESENBRINK, P. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v.356, n.18, p.1809-1822, may 2007.
- BONNARENS, F.; EINHORN, T.A. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. **Journal of Orthopaedic Research**, v.2, n.1, p.97-101, Jan.1984.
- BOONEN, S. Addressing the age-related needs of osteoporotic patients with strontium ranelate. **Osteoporosis International**, v.21, Suppl 2, p.S415-423, Jun. 2010.
- BRANDÃO, C.M.R.; MACHADO, G. P.da M.; ACURCIO, F. de A.. Análise farmacoeconômica das estratégias de tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.52, n.6, p.912-937, nov./dez, 2012.
- BRANKIN, E.; MITCHELL, C.; MUNRO, R. Closing the osteoporosis management gap in primary care: a secondary prevention of fracture programme. **Curr Med Res Opin**. v.21, n.4, p.475-482, apr. 2005.
- BRIZENO, L.A.C. **Avaliação da cicatrização em modelo de úlcera em mucosa oral de ratos portadores de diabetes Mellitus induzida por aloxano**. 2013. 75f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2013.
- BUCHOLZ, R.W.; BRUMBACK, R. J. Fraturas da diáfise do fêmur. *In*: ROCKWOOD, C.A. **Fraturas no adulto**. São Paulo: Manole, 1993. p.1623-1627.
- BUCKLEY, L.; GUYATT, G.; FINK, H.A.; CANNON, M.; GROSSMAN, J.; HANSEN, K.E.; HUMPHREY, M.B. et al. Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **American College of Rheumatology**, v.69, n.8, p.1521–1537, Aug. 2017.

CAMARGOS, M. C. S.; BONFIM, W.C. Osteoporose e expectativa de vida saudável: estimativas para o Brasil em 2008. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.25, n.1, p.106-102, jan./mar. 2017.

CAVALCANTE, J.C.C. e. **Efeitos do ibandronato de sódio na consolidação de fraturas femorais de ratos tratados com haste intramedular**. 2011. 73f. Dissertação. (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CHANG, I.C.; CHIANG, T.I.; YEH, K.T.; LEE, H.; CHENG, Y.M. Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. **Osteoporosis International**, v.21, n.8, p.1401-1409, Aug. 2010.

CLÉZARDIN, P. Anti-tumour activity of zoledronic acid. **Cancer Treatment Reviews**, v. 31, n. Suppl.3, p. S1-S8, 2005.

COHEN, P.A. The FDA and adulterates supplements-dereliction of duty. **JAMA Network Open**, v.1, n.6, p.e183329, Oct. 2018.

COSMAN, F.; BEUR, S.J.; LeBOFF, M.S.; LEWIECKI, E.M.; TANNER, B.; RANDALL, S.; LINDSAY, R. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v.25, n.10, p.2359-2381, 2014.

COUDROY, R.; JAMET, A.; PEÑYEKAS, O.; THILLE, A.W. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative. **Intensive Care Medicine**, v.41, n.6, p.1159-1160, jun. 2015.

CRAMER, J.A.; GOLD, D.T.; SILVERMAN, S.L.; LEWIECKI, M.E. A systematic review of persistence and compliance with bisphosphonates for osteoporosis. **Osteoporosis International**, v.18, n.8, p.1023-1031, Aug. 2007.

CUI, P.; LIU, H.; SUN, J.; AMIZUKA, N.; SUN, Q.; LI, M. Zoledronate promotes bone formation by blocking osteocyte-osteoblast communication during bone defect healing. **Histology & Histopathology**, v.33, n.1, p.89-99, Jan. 2018.

DEEKS, E.D.; PERRY, C.M. Zoledronic acid: a review of its use in the treatment of osteoporosis. **Drugs & Aging**, v.25, n.11, p.963-986, 2008.

DINÇEL, E.; SEPICI-DINÇEL, A.; SEPICI, V.; ÖZSOY, H.; SEPICI, B. Hip fracture risk and different gene polymorphisms in the Turkish population. **Clinics**, v.63, n.5, p.645-50, 2008.

DORE, N.; KENNEDY, C.; FISHER, P.; DOLOVICH, L.; FARRAUTO, L.; PAPAIOOANNOU, A.. Improving care after hip fracture: the fracture? Think osteoporosis (FTOP) program. **BioMed Central Geriatrics**, v.13, p.130, 2013.

DUARTE, F.O.S. **Propriedades funcionais do colágeno e sua função no tecido muscular**. 2011. 35f. Seminário (Mestrado em Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

EASTELL, R.; BAUMANN, M.; HOYLE, N.R.; WIECZOREK. **Bone markers-biochemical and clinical perspectives**. London: Martin Dunitz, 2001.

EI-KHASSAWNA, T.; MERBOTH, F.; MALHAN, D.; BÖCKER, W.; DAGHMA, D.E.S.; STOETZEL, S.; KERN, S.; HASSAN, F.; ROSENBAUM, D.; et al. Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis. **The American Journal of Pathology**, v.187, n.8, p.1686-1699, Aug. 2017

ETTINGER, B.; BLACK, D.M.; MITLAK, B.H.; KNICKERBOCKER, R.K.; NICKELSEN, T.; GENANT, H.K.; CHRISTIANSEN, C.; DELMAS, P.D.; ZANCHETTA, J.R.; STAKKESAD, J.; GLUER, C.C.; KRUEGER, K.; COHEN, F.J.; ECKERT, S.; ENSRUD, K.E.; AVIOLI, L.V.; LIPS, P.; CUMMINGS, S.R.. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. Results from a 3-year randomized clinical trial. **JAMA**, v.282, n.7, p.637-645, aug.1999.

FALAVINHA, R.S. Fixação biológica das fraturas multifragmentárias do fêmur. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.31, n.6, p.449-456, jun. 1996.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.2, p.274-80, mar./abr. 2005.

FERNANDES, H.J.A.; REIS, F. B. dos; TUCCI NETO, P. F.; BELANGERO, W.D. Placa em ponte e haste intramedular bloqueada: estudo comparativo no tratamento de fraturas multifragmentárias da diáfise do fêmur. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.37, n.9, p.392- 398, set. 2002.

FERREIRA JUNIOR, C.D.; CASADO, P.L.; BARBOZA, E.S.P. Osteonecrose associada aos bifosfonatos na Odontologia. **Revista de Periodontia**, Belo Horizonte-MG, v. 17, no. 4, p. 24-30, dez. 2007.

FERREIRA, F.P.C.; BANSI, L.O.; PASCHOAL, S.M.P. Serviços de atenção ao idoso e estratégias de cuidado domiciliares e institucionais. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.17, n.4, p.911-926, 2014.

FLEISCH, H. Development of bisphosphonates. **Breast Cancer Research**, v.4, n.1, p.30- 34, 2002.

FRIEDMAN, P.A. Fármacos que afetam a homeostasia dos íons minerais e a renovação óssea. In: BRUNTON, L. L.; LAZP, J. S.; PARKER, K. L. (ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.1489-1517.

GALI, J.C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.9, n.2, p.53-62, Apr./June 2001.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. Tradução de Thais Porto Amadeu. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

GIBSON, C. J. **Pathology of bone fractures**. 2003. Disponível em: [www.uwo.ca/pathol/cases/skeletal/fracture.html](http://www.uwo.ca/pathol/cases/skeletal/fracture.html). Acesso em: 14 jun. 2019.

GIORDANO, M.; TAMANINI, A.; GIORDANO NETO, V.; APFEL, M. I. R.; ELIAS, N.; GRAÇA, R.; KNACKFUSS, I. Influência da enoxaparina na consolidação das fraturas: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.34, n.3, p.208-213, mar. 1999.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**, v.3, p. 1-15, Jan. 2011.

GREEN, J.R. Estrogen receptor transcription and transactivation: Antitumor potential of bisphosphonates. **Breast Cancer Research**, v.3, n.1, p.1-24, May 2001.

GREENSPAN, S.L.; PERERA, S.; FERCJKAK, M.A.; NACE, D.A.; RESNICK, N.M. Efficacy and safety of single dose zoledronic acid for osteoporosis in institutionalized elderly women. **JAMA Internal Medicine**, v.175, n.6, p.913-921, Jun. 2015.

GRIZ, L.; COLARES, V.; BANDEIRA, F. Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v.50, n.5, p.845-851, Out. 2006.

GUARNIERO, R.; MOLLIN, É. D.I.; VAZ, C. E.S.; SANTANA, P.J.; CINAGAWA, F.T.; TATIBANA, W.S. Avaliação do efeito da glicosamina e condroitina na consolidação de fraturas: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.42, n.7, p.201-205, 2007.

GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L. G. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. *Revista Brasileira de Ortopedia*, São Paulo, v.39, n.9, p.477-485, set. 2004.

GUTIÉRREZ-POLO, R.. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **An Sist Sanit Navar**, v.26, Suppl 3, p.63-80, 2003.

HALL, L.H.; CLARKE, K.W. Medicação pré-anestésica. *In*: HALL, L.H.; CLARKE, HEBERT, S.; XAVIER, R.; PARDINI JR, A. G.; BARROS FILHO, T.E.P. **Ortopedia e traumatologia: princípios e prática**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2003.

HEBERT, S.; XAVIER, R.; PARDINI JÚNIOR, A. G.; BARROS FILHO, T. E.P. **Ortopedia e traumatologia: princípios e prática**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

INOUE, K.; PEDRAZZANI, E. S.; PAVARINI, S. C. I.. Octogenários e cuidadores: perfil sócio-demográfico e correlação da variável qualidade de vida. **Texto & Contexto – Enfermagem**, Florianópolis, v.17, n.2, p.350-357, 2008.

JACOBS, C.R. The mechanobiology of cancellous bone structural adaptation. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v.37, n.2, p.209-216, mar./apr. 2000.

JACOBSEN, C.; ZWAHLEN, R.A.; GRATZ, K.W. Clinical experiences with bisphosphonate-induced osteochemonecrosis of the jaws: a new entity for clinicians. **Swiss Society of Internal Medicine**, v.136, n.31-32, p.504-509, Sep. 2006.

JAMACARU, F.V.F. **Quantificação de angiogênese corneana *in vivo* através do processamento de imagens digitais**. 2006. 243f. Tese. (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

JEE, W.S.S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v.1, n.3, p.193-207, Mar. 2001.

JOENG, K.S.; LEE, Y.C.; LIM, J.; CHEN, Y.; JIANG, M.M.; MUNIVEZ, E.; AMBROSE, C.; LEE, B.H. Osteocyte-specific WNT1 regulates osteoblast function during bone homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.127, n.7, p.2678–2688, Jun. 2017.

JUDAS, F.; PALMA, P.; FALACHO, R. I.; FIGUEIREDO, H. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. Coimbra: Clínica Universitária de Ortopedia, HUC, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v.41, n.3, p.267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANIS, J.A.; BORGSTROM, F.; DE LAET, C.; JOHANSSON, H.; JOHNNELL, O.; JONSSON, B.; ODEN, A.; ZETHRAEUS, N.; PFLEGER, B.; KHALTAEV, N. Assessment of fracture risk. **Osteoporosis International**, v.16, n.6, p.581-589, jun. 2005.

KEAVENY, T.M.; DONLEY, D.W.; HOFFMANN, P. F.; MITLAK, B.H.; GLASS, E.V.; SAN MARTIN, J.A. Effects of teriparatide and alendronate on vertebral strength as assessed by finite element modeling of QCT scans in women with osteoporosis. **Journal of Bone Mineral Research**, v.22, n.1, p.149-157, Jan. 2007.

KHAJURIA, D.K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, R.D. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.51, n.4, p.365-382, 2011.

KHAJURIA, D.K.; RAZDANA, R.; MAHAPATRAB, D. R.. Efeitos da terapia combinada com ácido zoledrônico e propranolol na resistência mecânica em um modelo de rato com osteoporose por desuso. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.55, n.6, p.501- 511, Nov./Dec. 2015.

KHAJURIA, D.K.r; DISHA, C.; RAZDAN, R.; MAHAPATRAB, R.D. Efeito combinado do ácido zoledrônico e do alfacalcidol no tratamento da osteoporose por desuso em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.55, n.3, p.240–250, 2015.

KHOSLA, S.; BILEZIKIAN, J.P.; DEMPSTER, D.W.; LEWIECKI, E.M.; MILLER, P.D.; NEER, R.M.; RECKER, R.R.; SHANE, E.; SHOBACK, D.; POTTS, J.T. Benefits and Risks of Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.97, n.7, p.2272–2282, July 2012.

KIERSZENBAUM, B.L.; TRES, L.L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIMMEL, D.B. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (Ed.). **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996.

KONG, C.H.; STEFFI, C.; SHI, Z.; WANG, W.. Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v.106, n.8, p.2878-2887, Nov. 2018.

KONNO, S.; SUZUKI, S.; MASUDA, M.; NAGANE, Y.; TSUDA, E.; MURAI, H.; IMAI, T.; FUJIOKA, T.; SUZUKI, N.; UTSUGISAWA, K. Association between glucocorticoid-induced osteoporosis and myasthenia gravis: a cross-sectional study. **PLoS ONE**. v.10, n.5, p.e0126579, maio 2015.

KOPSCHINA, M. I. **Modelo experimental em ratos no reparo ósseo do fêmur utilizando células mononucleares no plasma rico em plaquetas**. 2010 (Dissertação) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Faculdade de Medicina Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Porto Alegre, 2010.

KUCHEMANN, B.A. Envelhecimento populacional, cuidado e cidadania: velhos dilemas e novos desafios. **Sociedade e Estado**, Brasília, v.27, n.1, p.165-180, Jan./Abr. 2012.

KUMAR, V.; PASS, B.; GUTTENBERG, S.; LUDLOW, J.; EMERY, R.W.; TYNDALL, D.A.; PADILLA, R.J. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: A report of three cases demonstrating variability in outcomes and morbidity. **The Journal of the American Dental Association**, v.138, n.5, p.602-609, May 2007.

KUPCZIK, F.; VIALLE, L.R.G.; NOBRE, L.O.; VIEIRA, L.A.; FERNANDES, A.E.O. Influência da ciprofloxacina na consolidação óssea de fraturas de fêmur em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.17, n.4, p.228-231, 2009.

LANG, M.; ZHOU, Z.; SHI, L.; NIU, J.; XU, S.; LIN, W.; CHEN, Z.; WANG, Y. Influence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.54, n.8, p.889-893, oct. 2016.

LASH, R.W.; NICHOLSON, J.M.; VELEZ, L.; VAN HARRISON, R.; McCORT, J. Diagnosis and management of osteoporosis. **Prim care.**, v.36, n.1, p.181-198, Mar. 2009..

LEONE, E.T.; MAIA, A.G.; BALTAR, P.E. Mudanças na composição das famílias e impactos sobre a redução da pobreza no Brasil. **Economia e Sociedade**, Campinas, v.19, n.1, p.59-77, abr. 2010.

LEWIECKI, E.M.; RECKER, R.R.; SEDARATI, F. *et al.* Bone mineral density gains with monthly oral ibandronate (150mg) and weekly oral alendronate (70mg) after 12 months: results from the motion study. **Curr Med Res Opin.**, v.26, p.6-11, 2007.

LICATA, Angelo A. Bisphosphonate therapy. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.313, n.1, p.17-22, Jan. 1997.

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v.18, n.2, p.75-85, Feb. 1996.

LUFT, A.; MENDES, F.F. S(+) cetamina em baixas doses: atualização. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v.55, n.4, p.460-469, Jul./Ago. 2005.

LUNA, S.P.L.; NOGUEIRA, C.S.; CRUZ, M.L.; MASSONE, F.; CASTRO, G.B.. Romifidine or xylazine combined with ketamine in dogs premedicated with methotrimeprazine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, n.2, p.93-98, 2000.

MAINARDES, K.C.; VIANA NETTO, R.; DONOSO, C. P. M.; KUME, P. K.; KUME, K. Y.; BUSATO, T. S. Efeito do diabetes associado ao envelhecimento na consolidação de fraturas na tíbia de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.42, n.3, p.55-63, 2007.

MARIE, P.J.; KASSEM, M. Extrinsic mechanisms involved in age-related defective bone formation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.96, n.3, p.600-609, Mar 2011.

MARTIN, M.B.; GRIMLEY, J. S.; LEWIS, J.C.; HEATH, H.T.; BALLEY, B. N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CALDERA, A.; LIRA, R.; URBINA, J.A.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; CROFT, S. L.; OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*:

a potential route to chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.6, p.909-116, Mar. 2001.

MATOS, M.A.; ARAÚJO, F.P.; PAIXÃO, F.B. Efeitos do zoledronato na remodelação óssea durante o processo de reparação. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Rio Claro, SP, v.22, n.2, p.115-119, 2007.

MENDES, P.H.B.; SCOFANO JUNIOR, A.R.; SILVA, M.G.; SOUZA, I.; SILVA FILHO, N. M.; ABREU, A.V.; ELIAS, N.; APFEL, M. I. R. Consolidação da fratura após o uso prolongado de corticóide: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.36, n.9, p.345-351, set. 2001.

MESQUITA, C.J.G.; LEITE, J.A.D.; FECHINE, F.V.; ROCHA, J. L.de C.; LEITE, J. G.; LEITE FILHO, J. A.; BARBOSA FILHO, R.C. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. **Burns**, v.36, n.1, p.97-108, Feb. 2010.

MILLER, P.D.; EPSTEIN, S.; SEDARAT, F.; REGINSTER, J.Y.. Once-monthly oral ibandronate compared with weekly oral alendronate in postmenopausal osteoporosis: results from the head-to-head MOTION study. **Current Medical Research and Opinion**, v.24, n.1, p.207-213, Jan. 2008.

MINAYO, M.C.de S.. O envelhecimento da população brasileira e os desafios para o setor saúde. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.28, n.2, p.208-209, fev. 2012.

MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. da C. G.; SILVA, A.L.A. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.3, p.507-519, maio/jun. 2016.

MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. Bone growth factors. **Clin Orthop Relat Res.**, v.263, p.30-48, Feb. 1991.

MONEY, S. The Risks of Chronic Corticosteroid Exposure. **Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy**, v.31, n.2, p.160-161, Jun. 2017.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picrosirius- polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, supl. 3, p.1-11, 1991.

MORAES, F.B.; SILVA, L.L.; FERREIRA, F.V.; FERRO, A.M.; ROCHA, V.L.; TEIXEIRA, K.S. Avaliação epidemiológica e radiológica das fraturas diafisárias do fêmur: estudo de 200 casos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.44, n.3, p.199-203, 2009.

MÜLLER, S.S.; CURCELLI, E.C.; SARDENBERG, T.; ZUCCON, A.; CRUDIS JÚNIOR, J.L.de; PADOVANI, C.R. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.12, n.4, p.197-204, out./dez, 2004.

MUNIZ, L.R.F.; FARIA, M.H.G.; VASCONCELOS, P.R.L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.5, p.529-534, Mai. 2004.

MURATSU, D.; YOSHIGA, D.; TAKETOMI, T.; ONIMURA, T.; SEKI, Y.; MATSUMOTO, A.; NAKAMURA, S. Zoledronic acid enhances lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reactions through controlle de expression of SOCS1 in macrophages. **Plos One**, v.8, n.7. p.67906, Jul. 2013.

NEER, R.M.; ARNAUD, C.D.; ZANCHETTA, J.R.; PRINCE, R.; GAICH, G.A.; REGINSTER, J-Y.; HODSMAN, A.B.; ERIKSEN, E.F.; ISH-SHALOM, S.; GENANT, H.K.; WANG, O.; MELLSTRÖM, D. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v.344, n.19, p.1434- 1441, May 2001.

NGUYEN, B. N.T; HOSHINO, H.; TOGAWA, D.; MATSUYAMA, Y. Cortical thickness index of the proximal femur: a radiographic parameter for preliminary assessment of bone mineral density and osteoporosis status in the age 50 years and over population. **Clinics Orthopeduc Surgery**, v.10. n.2, p149-156, Jun 2018.

OLIVEIRA, L.G. **Osteoporose**: guia para diagnóstico, prevenção e tratamento. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.

ORR, E.R.; PASCHOAL, Y.J. P.; GIORDANO, V.; FRANKLIN, C.E.; AMARAL, N. P. Fixação biológica das fraturas multifragmentárias da diáfise do fêmur pela técnica de placa em ponte. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.37, n.1/2, p.31-38, 2002.

PALACIO, E.P.; JACOB, E.M.; CAMPI, T.B.; MÜLLER, S.S. O zoledronato no tratamento da osteoporose umeral em ratas. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.2, p.95-95, 2010.

PEREIRA, A.J.F.. **Caracterização da diáfise do fêmur por reflexão e retroespalhamento ultrassônico em modelo animal in vivo e in vitro**. 2012. 67f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, Rio de Janeiro, 2012.

PEREIRA, F.R.A.; DUTRA, R.C.; OLÍMPIO, T.C.R.; MÜLLER, S.S.; PALACIO, E.P. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.44, n.1, p.61-68, 2009.

PEREIRA, V.J. S. **Biologia da remodelação óssea**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

PERILLI, E.; LE, V.; MA, B.; SALMON, P. L. Detecting early bone changes using in vivo micro- CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. **Osteoporosis International**, v.21, n.8, p.1371-1382, ago. 2010.

PIETSCHMANN, P.; RAUNER, M.; SIPOS, W.; KERSCHAN-SCHINDL, K. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease--a mini-review. **Gerontology**, v.55, n.1, p.3-12, 2009.

PORTAL NOVARTIS. **Ácido zoledrônico**. 2016. Disponível em: <https://portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/1717.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2019.

PRESTES, R.C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.1, p.65-74, jan. 2013.

RADOMINSKI, S.C.; BERNARDO, W.; PAULA, A.P.; ALBERGARIA, B.H.; MOREIRA, C. *et al.* Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.57, n.S2, p.S452-S466, 2017.

RAGI-EIS, S.; FRANCISCHETTO, I.F.; ALBERGARIA, B.; OLIVEIRA, A.A.; SIMÕES, F.V.; MILAGRE, K. *et al.* Percepções de conveniência e preferência após 1 ano de tratamento com bisfosfonato oral em um grupo de mulheres brasileiras. **Revista Brasileira de Doenças Osteometabólicas**, v.2, n.2, p.41-47, 2007.

REIS, F.B. **Fraturas**. São Paulo: Atheneu, 2007.

RIBEIRO, P.G.A. **O tratamento conservador das fraturas na criança**. 2015. 43f. Dissertação. (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade do Porto, Porto, 2015.

RICO, H.; GOMES-RASO, N.; REVILLA, M. E.; HERNÁNDEZ, E.R.; SECO, C.; PÁEZ, E.; CRESPO, E. R. Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats: a morphometric and densitometric study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.90, n.1, p.97-101, may 2000.

RIGGS, LB.; MELTON, JL. Involutional osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v.314, n.26, p.1676-1686, Jun. 1986.

ROCHA, F.A.C.; RIBEIRO, A.R. Low incidence of hip fractures in an equatorial area. **Osteoporosis International**, v.14, n.6, p.496-499, Jun. 2003.

RODRIGUES, V. **Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. 2009. 134f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROMANO, L.; FERRIGNO, C.R.A.; FERRAZ, V. C.M.; NINA, M. I. D.; ITO, K.C. Avaliação do uso de haste bloqueada e bloqueio transcortical no reparo de fraturas diafisárias de fêmur em felinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28 n.4, p.201-206, abr. 2008.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas em correlação com biologia celular e molécula. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SAMPAIO NETTO, O.; COUTINHO, L. de O. L.; SOUZA, D. C. de. Análise da nova classificação de laudos de densitometria óssea. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v.40, n.1, p.23-25, Jan./Fev. 2007.

SANTIN, S.P. **Avaliação morfológica e biomecânica dos efeitos da radiação gama em osso humano liofilizado ou congelado**. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2014.

SANTOS, K.S. **Princípios da cicatrização óssea**. 2011. 43f. Seminário. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2011.

SAVILLE, P.D. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a modelo of osteoporosis. **Journal of the American Geriatrics Society**, v.17, n.2, p.155-166, Feb. 1969.

SCHENDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P.; LITTLE, D.G. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.19, n.5, p.459- 466, 2008.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K. L. Hormônio adrenocorticotrófico, esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDOM, R.W. **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1082-1102.

SCHINDELER, A.; McDONALD, M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in Cell Developmental Biology**, v.19, n.5, p.459– 466, Aug. 2008.

SCHWARTSMANN, C.; LECH, O.; TELOKEN, M. **Fraturas**: princípios e prática. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SENTÜRK, M.F.; CIMEN, E.; TUZUNER ÖNCÜL, A. CAMBAZOGLU, M. Oncologists awareness about bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.66, n.7, p. 880-883, Jul. 2016.

SILVA, J.V.F.; SILVA, E.C.; RODRIGUES, A.P.R.A.; MIYAZAWA, A.P. A relação entre o envelhecimento populacional e as doenças crônicas não transmissíveis: sério desafio de saúde pública. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Maceió, v.2, n.3, p.91-100, maio 2015.

SILVA, L.C.C.; FARIAS, L.M.B.; OLIVEIRA, T.S.; RABELO, D.F. Atitude de idosos em relação à velhice e bem-estar psicológico. **Revista Kairós Gerontologia**, v.15, n.2, p.119-140, Jun. 2012.

SILVA, P.G.B. **Expressão de marcadores inflamatórios na osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos e efeito do tratamento crônico com ácido zoledrônico nos tecidos gengival e ósseo dentário de ratos**. 2016. 118f. Tese. (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SIRIS, E.S.; HARRIS, S.T.; ROSEN, C.J.; BARR, C.E.; ARVESEN, J.N.; ABBOTT, T.A.; SILVERMAN, S. Adherence to bisphosphonate Therapy and fracture rates in osteoporotic women: relationship to vertebral and nonvertebral fractures from 2 US claims databases. **Mayo Clinic Proceedings**, v.81, n.8, p.1013-1022, Aug. 2006.

SOARES, D.S.; MELLO, L.M.; SILVA, A.S.; MARTINEZ, E.Z.; NUNES, A.A. Fraturas de fêmur em idosos no Brasil: análise espaço-temporal de 2008 a 2012. **Caderno de Saúde Pública**, v.30, n.12, p.2669-2678, dez, 2014.

SOUSA, V.L. **Efeitos do ultra som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*)**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SOUZA, M.P.F. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.45, n.3, p.220-229, maio/ jun. 2010.

SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SWIFT, C.G. Identifying risk can reduce fall rates. **Practitioner**, v.251, n.1693, p.39- 49, Apr. 2007.

SYED, F. A.; NG, A. C. The pathophysiology of the aging skeleton. **Current Osteoporosis Reports**, v.8, n.4, p.235-240, Dec. 2010.

TADAKORO, H.. Farmacoeconomia e custo efetividade dos bifosfonatos no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina**, v.66, n.10, p.335-341, out. 2009.

TAVARES, V.; CANHÃO, H.; GOMES, J.A. M.; SIMÕES, E.; ROMEU, J. C.; COELHO, P.; SANTOS, R.A.; MALCATA, A.; ARAÚJO, D.; VAZ, C.; BRANCO, J. Recomendações para o diagnóstico e terapêutica da osteoporose. Sociedade Portuguesa de Reumatologia, Sociedade Portuguesa de Doenças Ósseas Metabólicas. **Acta Reumatologia Portuguesa**, v.32, p.49-59, 2007.

TEIXEIRA, G.F.D. **Efeitos do carbonato de lodenafil na consolidação de fraturas da diáfise femoral de ratos tratados com haste intramedular**. 2010. 70f. Dissertação. (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

THOMPSON, A.; SKINNER, A.; PIERCY, J. **Fisioterapia de Tidy**. 12.ed. São Paulo: Santos; 1994.

THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, J.G. Veterinary anesthesia. In: TRANQUILLI, William J.; THURMON, John C.; GRIMM, Kurt A. **Lumb & Jones veterinary anesthesia and analgesia**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2007.

TREISTER, N.; FRIEDLAND, B.; WOO, S.J. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.109, n.5, p.753-764, 2010.

TUCCI, J.R. Therapy with zoledronic acid, 5 mg, for a patient with Paget disease of bone. **Endocrine Practice**, v.14, n.5, p.607-10, Jul/Ago, 2008.

UDUPA, K.N.; PRASAD, G.C. Chemical and histochemical studies on the organic constituents in fracture repair in rats. **The Bone & Joint Journal**, v.45, n.4, p.770-779, Dec. 1963.

VASCONCELOS, A.M.N.; GOMES, M. M. F. Transição demográfica: a experiência brasileira. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.21, n.4, p.539-548, dez. 2012. VERA, J.L.C.P.; MARCOS, J.A.G.; RODRÍGUEZ, S.A.; ARENAS, M.G.; POLANCO, J.C. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial**, v.29, n.5, p.295-308, 2007.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R.; BOECHAT, R.; BLEY, J.P.; SCUSSIATO, R.; BUSATO, T.; CARVALHO, D.; FEDATTO, F.; FERNANDES, B.; TORRES, Ricardo. Produção de fratura padronizada de fêmur em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.39, n.6, p.323-329, 2004.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**, v.17, n.3, p. 319-336, 2006.

WALTER, C.; GRÖTZ, K.A.; KUNKEL, M.; AL-NAWAS, B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. **Support Care Cancer**, v.15, n.2, p.197-202, 2007.Feb.

WEINSTEIN, R. S. Glucocorticoid-induced bone disease. **The New England Journal of Medicine**, v.36, n.1, p.62–70, July, 2011.

WOO, S.-B.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. **Annals of International Medicine**, v.144, n.10, p.753-761, 2006.

YANIK, B.; TURKAY, C.; ATALAR, H. Hepatotoxicity induced by alendronate therapy. **Osteoporosis International**, v.18, n.6, p.829-831, Jun. 2007.

ZERBINI, C.A.F.; SZEJNFELD, V.L.; ABERGARIA, B.H.; McCLOSKEY, E.V.; JOHANSSON, H.; KANIS, J.A. Incidence of hip fracture in Brazil and the development of a FRAX model. **Arch Osteoporos**, v.10, p.224, 2015.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

**CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO CRISTUS

**Unichristus**  
Centro Universitário Cristus

Of. No. 041/17

Protocolo da CEUA: 041/17

Pesquisador Responsável: Profa. SÂNIA NARA COSTA DA ROCHA

Título do Projeto: EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS NA DIÁFISE DOS FÊMURES DE RATOS OSTEOPORÓTICOS TRATADOS COM OSTEOSSÍNTESE INTRAMEDULAR.

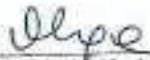
Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 27 (vinte e sete) de setembro de 2017.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Ratos Wistar, machos, pesando entre 250 a 350 gramas.	Número Ancestral:	60
----------	---	-------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 27/09/2018.

Fortaleza, 27 de setembro de 2017.

  
\_\_\_\_\_  
Olga Vale Oliveira Machado  
Coordenadora  
CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

Campus Bebedouro: Rua. S. João Batista, 1140 - Bebedouro - SP - 13506-900 - Fone: (11) 3399-9000  
 Campus Curitiba: Rua. S. João Batista, 1140 - Curitiba - PR - 81200-000 - Fone: (41) 3399-9000  
 Campus São Paulo: Rua. S. João Batista, 1140 - São Paulo - SP - 04000-000 - Fone: (11) 3399-9000  
 Campus Fortaleza: Rua. S. João Batista, 1140 - Fortaleza - CE - 60000-000 - Fone: (85) 3399-9000