

MARIANA FREITAS DE JESUS

**EFEITOS DO RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO À VIBRAÇÃO
MECÂNICA DE BAIXA INTENSIDADE E FREQUÊNCIA NO TECIDO ÓSSEO
DE RATAS OSTEOPÊNICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina para Obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

MARIANA FREITAS DE JESUS

**EFEITOS DO RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO À VIBRAÇÃO
MECÂNICA DE BAIXA INTENSIDADE E FREQUÊNCIA NO TECIDO ÓSSEO
DE RATAS OSTEOPÊNICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina para Obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

São Paulo
2014

FREITAS-JESUS, M

Efeitos do ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência no tecido ósseo de ratas osteopênicas/ Mariana Freitas de Jesus – São Paulo, 2014.

Xix,113f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em inglês: Effects of strontium ranelate associated with mechanical vibration of low intensity and high frequency in the bone tissue of osteopenic rats.

1. Tecido Ósseo. 2. Ranelato de Estrôncio. 3. Vibração Mecânica. 4. Morfologia. 5. Osteoporose.

Orientador:

Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

Profa. Adjunta da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de

Medicina – UNIFESP/EPM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA



Chefe do Departamento: Profa. Dra. Sima Godosevicius Katz

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Janete Maria Cerutti

DISCIPLINA DE HISTOLOGIA E BIOLOGIA ESTRUTURAL



Chefe da Disciplina: Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

MARIANA FREITAS DE JESUS

EFEITOS DO RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO Á VIBRAÇÃO DE BAIXA
INTENSIDADE E BAIXA FREQUÊNCIA NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS OSTEOPÊNICAS

Presidente da banca:

Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. _____

Profa. _____

Profa. _____

Suplente:

Profa. _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a Maria Lúcia de Freitas, a eterna e incondicional incentivadora dos meus sonhos, minha companheira, amiga, cúmplice, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, que por muitas vezes abdicou de seus desejos e sonhos para realizar os meus, te amo Mamys. Ao senhor Manoel Batista de Jesus Filho, que sempre me incentivou a não desistir dos meus desejos e sonhos, que fez todos os esforços possíveis para dar continuidade a essa jornada, me dando força para pleitear essa formação, te amo Popys. Palavras não são capazes de expressar o quanto sou grata aos meus pais por terem me dado não somente à vida, como também me proporcionado à chance de futuro promissor, muito obrigada!! Amo vocês.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por ter me dado força durante esses anos de curso, em meio a dificuldades e, por ter me iluminado durante as decisões mais difíceis e por ter me guiado ao longo dessa jornada para trilhar o caminho correto. Quero agradecer também a todos os animais que perderam suas vidas durante esse curso para que esse trabalho pudesse ser realizado.

A minha orientadora Profa. Dra. **Rejane Daniele Reginato** por ter me dado à oportunidade de ingressar para seu grupo de pesquisa, por me acolher em seu laboratório e acreditar em mim durante todo esse período de trabalho, e por todos os momentos de descontração e carinho. Além de Professora você é uma grande amiga, muito obrigada pelos valiosos ensinamentos, incentivo, dedicação, paciência e muitos momentos de descontração, muito obrigada!!!!

“Ser Professor é muito mais do que transmitir o conhecimento, é aquele que ensina com dedicação e paciência, que quebra os nossos galhos, nos dão direção e liberdade, e quando tudo está difícil abre um sorriso e diz: Calma, você vai conseguir”

Ao Prof. Dr. **Eduardo Katchburian**, pelos valiosos ensinamentos. Sem dúvida nenhuma, um dos maiores cientistas e mestres que tive a oportunidade de conhecer.

Ao Prof. Dr. **Manoel de Jesus Simões** por ter assinado inicialmente meu mestrado e por toda ajuda em diversos momentos dessa jornada.

A Profa. Dra. **Marise Lazaretti Castro** por intermediar junto à indústria farmacêutica Servier e disponibilizar todo o medicamento PROTOS para o tratamento dos animais, por abrir as portas para a realização das análises densitométricas, por ceder gentilmente a gaiola vibratória para ratos (desenvolvida pelo Departamento de Bioengenharia da USP – São Carlos), e por todas as sugestões científicas, disponibilidade de tempo e integração com esse trabalho. Obrigada!

À Profa. Dra. **Helena Bonciani Nader** (Departamento de Bioquímica – UNIFESP) por colaborar e ceder o espaço em seu laboratório para as análises de biologia molecular.

À **Valquíria Medeiros, Gabi (iniciação científica) e Aline (técnica)** pela paciência e valiosa ajuda durante todas as etapas das análises moleculares. Muito obrigado!

À Profa. Dra. **Keico Okino Nonaka** (UFSCar) por nos receber e ceder o espaço e os equipamentos em seu laboratório para as análises físicas e biomecânicas.

Aos alunos da professora Keico (UFSCar): **Fabio Pastor e Zé** por toda ajuda oferecida durante as análises biomecânicas e biofísicas, muito obrigada por toda calma e paciência. Obrigada também por toda simpatia e pela companhia em momentos de descontração.

À Dra. **Mônica Longo** (Disciplina de Endocrinologia - UNIFESP) pelas instruções para uso da gaiola vibratória, por suas sugestões científicas e por momentos de descontração.

Aos professores da disciplina de Histologia e biologia estrutural: **Dra. Rejane Daniele Reginato, Dr. Manuel de Jesus Simões, Dr. Eduardo Katchburian, Dra. Sima Godosevicius Katz, Dra. Cristiane Damas Gil**. Muito obrigada por todos os ensinamentos!

À secretária da pós-graduação **Sílvia Borragini Abuchaim** pela ajuda, paciência, compreensão e carinho. Muito obrigada!

Aos companheiros e amigos de laboratório: **Aline Hidalgo, Mariana (Japa), Sabrina (Ninja), Talissa, Priscilinha, Débora Anne, Márcio Moura, PatiTec, Jéssica, Ana Paula, Ewerton, Vitor Hugo e Rafael Pacheco**. Agradeço todos vocês por todo apoio durante esse trabalho, todos vocês não são somente companheiros, mas sim grandes amigos que me ensinaram muito. A **Jenifer Freitas Campos**, minha companheira e amiga durante todo o mestrado, obrigada por sua disponibilidade em ajudar, seu carinho e por muitos momentos de gargalhadas. Obrigada, adoro você! E a **Patrícia Gonçalves**, minha companheira de trabalho e grande amiga, obrigada por toda sua ajuda, pelos momentos de conversas e descontração. Te adoro !!!

Aos colegas de disciplina: **Carina, Luiz Fuchs, Carla Maganhin, Regina Célia, Rinaldo Florêncio, Miriam Santos, Adriana Carbonel, Wémerson Ferreira, Leonardo Lombardi**. Obrigada!!!

Aos funcionários e amigos da disciplina de histologia: **Kellen Martins, Senhor Pedro, Dona Cida, Senhor Ednaldo, Dona Sandra, Paulinho e Licurgo**. Obrigada!!!!

À **Geni**, Técnica da Disciplina de Endocrinologia – UNIFESP pela assistência na realização da densitometria óssea. Muito obrigado pela valiosa ajuda!

Aos meus amigos **Monique, Adan, Rafa e Bruna Regina** por todo carinho, preocupação e principalmente pela torcida de todos durante o mestrado. Amo vocês!!

Ao meu irmão **Maurício** que sempre esteve ao meu lado me apoiando e dizendo sempre: Você consegue, acredite! Obrigada por todos os momentos de descontração, Te amo!

A minha **Tia Ifigênia** por todo seu carinho, amor, compreensão nos momentos difíceis, amizade e principalmente por toda sua ajuda quando mais precisei e torcida durante toda minha jornada acadêmica. Te amo Tia!!!

Aos meus primos **Stefanie e Dalmo** por sempre torcerem por mim, me apoiando nos momentos difíceis com muito carinho e amor. Obrigada, Amo vocês!

A família **Ires** por toda torcida, ajuda e carinho nessa jornada. Amo vocês!!

Ao **Lucas Bucheroni Martins** por todo carinho, compreensão, paciência e companheirismo durante muitas tardes, noites e madrugadas de estudos, principalmente nos finais de semana e feriados prolongados, rs. Obrigada por tudo, especialmente por seu amor! Amo você.

E a todos os meus amigos e familiares que sempre torceram por mim.

Trabalho realizado com apoio financeiro
concedido pela Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior – CAPES.

Dedicatória	vi
Agradecimentos.....	vii
Listas	xiii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xv
Resumo	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Tecido Ósseo	01
1.2. Osteoblastos	03
1.3. Osteócitos.....	05
1.4. Osteoclastos.....	07
1.5. Matriz Óssea	10
1.6. Osteoporose	12
1.7. Ranelato de Estrôncio	14
1.7.1. Estudos com Modelos Animais.....	18
1.8. Vibração Mecânica	22
1.8.1. Estudos com Modelos Animais.....	25
1.8.2. Agentes Mecânicos e não Mecânicos no Tecido Ósseo	27
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais de Experimentação	30
3.2. Obtenção dos Animais com Osteopenia.....	30
3.2.1. Ooforectomia Bilateral	30
3.2.2. Pós Operatório.....	32
3.2.3. Procedimento para Exames Colpocitológicos.....	32
3.2.4. Tratamento dos Animais.....	32
3.3. Procedimento de Vibração Mecânica	33
3.4. Densitometria Óssea	34
3.5. Eutanásia dos Animais e Retirada dos Fêmures e Tíbias	35
3.5.1. Mensuração do Comprimento e Espessura dos Fêmures e Tíbias	35

3.6. Análises das Propriedades Físicas e Biomecânicas em Tíbias e Vértèbras..	36
3.6.1. Propriedades Físicas das Tíbias e Vértèbras	36
3.6.2. Propriedades Biomecânicas das Tíbias e Vértèbras	37
3.7. Análises Histológicas: Histomorfometria e Histoquímica	39
3.7.1. Histomorfometria	40
3.7.2. Histoquímica: Picro Sirius Red	41
3.7.3. Técnica do TRAP	42
3.8. Análises Biomoleculares	42
3.8.1. Extração, Identificação e Quantificação dos Glicosaminoglicanos no Fêmur	42
3.8.2. Quantificação do Ácido Hialurônico pelo método ELISA	43
3.9. Análise Estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Massa Corporal	45
4.2. Análise Biométrica dos Fêmures e Tíbias	45
4.3. Densitometria Óssea	46
4.4. Propriedades Biofísicas das Tíbias e Vértèbras	49
4.5. Propriedades Biomecânicas das Tíbias e Vértèbras	52
4.6. Histomorfometria	54
4.7. Histoquímica: Picro Sirius Red	58
4.8. Técnica do TRAP	61
4.9. Quantificação dos Glicosaminoglicanos	64
4.10. Quantificação do Ácido Hialurônico	65
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	81
7. ANEXOS	82
7.1. Parecer do comitê de ética em pesquisa	82
8. REFERÊNCIAS	83
Abstract	

Listas de figuras

Figura 01. Esquema ilustrativo das células que constituem o tecido ósseo e sua localização.....	02
Figura 02. Esquema ilustrativo representando os estágios de diferenciação da linhagem osteoclástica	09
Figura 03. Esquema ilustrando o efeito do ranelato de estrôncio na diferenciação dos osteoclastos.....	18
Figura 04. Fotos do procedimento cirúrgico da ooforectomia bilateral	31
Figura 05. Fotos demonstrando o procedimento de gavagem e a plataforma vibratória	33
Figura 06. Densitometria óssea de rata <i>Wistar</i> com 9 meses de idade.....	34
Figura 07. Linha do tempo do experimento	35
Figura 08. Fêmur de rata <i>Wistar</i> mostrando o local da secção	36
Figura 09. Esquema do ensaio biomecânico de flexão a três pontos realizados em tíbia.....	38
Figura 10. Esquema do ensaio biomecânico de compressão em vértebras	39
Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico do osso fêmur distal de rata <i>Wistar</i> corado pela hematoxilina e eosina (H.E)	41
Figura 12. Gráficos de massa corporal.....	45
Figura 13. Gráficos de comprimento e espessura dos fêmures e tíbias.....	46
Figura 14. Gráficos de densitometria óssea do corpo total	48
Figura 15. Gráficos de densitometria óssea do fêmur e tíbia	49
Figura 16. Gráficos das propriedades biofísicas das vértebras.....	50

Figura 17. Gráficos das propriedades biofísicas das tíbias	51
Figura 18. Gráficos das propriedades biomecânica das tíbias	52
Figura 19. Gráficos das propriedades biomecânicas das vértebras	53
Figura 20. Gráficos de histomorfometria do osso fêmur distal	54
Figura 21. Prancha de fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal evidenciados por HE. Histomorfometria: visão geral	56
Figura 22. Prancha de fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal evidenciados por HE. Histomorfometria: Detalhes	57
Figura 23. Prancha de fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal evidenciados por Picro Sirius Red sob microscópio de luz polarizada: Visão das regiões cortical e trabecular.....	59
Figura 24. Prancha de fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal evidenciados por Picro Sirius Red sob microscópio de luz polarizada: Detalhes.....	60
Figura 25. Gráficos das células TRAP-positivas no fêmur distal	61
Figura 26. Prancha de fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal submetidos ao método de TRAP	63
Figura 27. Gráfico de Condroitím Sulfato no fêmur	64
Figura 28. Perfil Eletroforético dos glicosaminoglicanos sulfatados	65
Figura 29. Gráfico dos níveis de Ácido Hialurônico no fêmur distal	66

Listas de abreviaturas e símbolos

AH	Ácido hialurônico
ALP	Fosfatase Alcalina
BMU	Unidades multicelulares básicas de remodelação óssea
BMP	Proteína morfogenética óssea
BSP	Sialoproteína óssea
BV/TV	Volume ósseo
Ca	Cartilagem articular
Ca ⁺²	Cálcio
CaR	Receptor sensível ao cálcio
CMO	Conteúdo mineral ósseo
CS	Condroitim sulfato
Ct	Osso cortical
Ct.Wi	Espessura do osso cortical
DEXA	Absorimetria de raio x de dupla energia
DMO	Densidade mineral óssea
DO	Densidade óssea
DS	Dermatam sulfato
DP	Desvio padrão
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GAG	Glicosaminoglicano
Gp	Disco epifisário
HE	Hematoxilina Eosina
HS	Heparam sulfato
IGF	Fator de crescimento de insulina
J	Joule
kg	Quilograma
L5	Quinta vértebra lombar
M	Molar
Ma	Medula óssea
MG	Miligrama
N	Newton

Nm	Nanômetro
N/mm	Newton/milímetro
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ooforectomia
PBS	Solução salina tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Pc	Peso das cinzas
PGE2	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Peso imerso
PS	Picro-sirius red
PTH	Paratormônio humano
PU	Peso úmido
QS	Queratam sulfato
RANK	Receptor ativador do fator nuclear k-B
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear k-B ligante
S1	Primeira vértebra sacral
SHD	Síndrome de Hipersensibilidade sistêmica a Droga
SrR	Ranelato de estrôncio
Seg	Segundo
Tb	Trabécula
TGF	Hormônio de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
VBM	Vibração mecânica
VCI	Vibração de corpo inteiro
VO	Volume ósseo
Vs	Versus
µg/mg	Micrograma/miligrama
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
ρ	Densidade da água destilada

Resumo

Introdução: O tecido ósseo é constituído por células e uma matriz extracelular calcificada. O desequilíbrio entre a taxa de formação e a reabsorção óssea pode ocasionar a osteoporose. O ranelato de estrôncio (SrR) é indicado para o tratamento da osteoporose severa, porém não se sabe se sua ação no tecido ósseo pode ser potencializada quando associado à vibração mecânica. **Objetivo:** Caracterizar as alterações do tecido ósseo de ratas osteopênicas submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio associado à estímulos mecânicos sobre a vibração mecânica de baixa intensidade e frequência. **Métodos:** Quarenta ratas *Wistar* adultas foram ooforectomizadas e após três meses divididas em 4 grupos: Grupo I (controle) - gavadas com solução veículo; Grupo II (SrR) - gavadas 625 mg/kg/dia de SrR - Grupo III (VBM) - submetidas a vibração mecânica por 20 min. à 60 Hz com intensidade de 0.6g/5 dias por semana – Grupo IV (SrR+VBM) - gavadas com 625 mg/kg/dia de SrR + vibração mecânica por 20 min. à 60 Hz com intensidade de 0.6g/5 dias por semana. Os animais foram pesados semanalmente e submetidos à densitometria óssea no início e após 90 dias de tratamento. Após a eutanásia os fêmures foram processados para análises histomorfométricas, histoquímica (Picro-Sirius red) e bioquímicas. Alguns cortes foram submetidos ao método de TRAP para quantificação de osteoclastos. As tíbias e as vértebras foram destinadas às análises biofísicas e biomecânicas. Todos os resultados foram avaliados estatisticamente com o teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey. **Resultados:** O grupo SrR foi o único a obter ganho em todos os parâmetros analisados pela densitometria óssea (DMO, CMO e Área), tanto na região de corpo total quanto na região do fêmur-tíbia. Também apresentou a maior DMO ao final do tratamento. O grupo SrR+VBM mostrou maior espessura e comprimento das tíbias, enquanto SrR apresentou somente maior espessura nos fêmures. O maior volume ósseo, capacidade em suportar cargas, rigidez e tenacidade foram observados no grupo SrR nas tíbias e vértebras. O grupo VBM apresentou maior percentual de material orgânico e volume ósseo nas tíbias, e nas vértebras SrR e SrR+VBM revelaram maior densidade mineral e percentual de material orgânico. As análises histomorfométricas revelaram que os grupos SrR e SrR+VBM apresentaram maior volume ósseo trabecular no fêmur do que o grupo VBM, e somente o SrR foi superior ao Controle. A espessura do osso cortical foi maior tanto

no grupo SrR quanto no SrR+VBM. Em relação ao colágeno a maior birrefringência avermelhada (colágeno maduro) foi observada no grupo SrR+VBM, e a maior birrefringência esverdeada (colágeno imaturo) no VBM. Observou-se uma diminuição nos níveis de condroitim sulfato em todos os grupos tratados quando comparados ao controle. A quantidade de ácido hialurônico foi superior no grupo VBM. **Conclusão:** O tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica, bem como o ranelato administrado de forma isolada exerceram efeito positivo nos constituintes do tecido ósseo acelerando o processo de remodelação e promovendo o reestabelecimento da microarquitetura óssea em ratas osteopênicas.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, composto por diferentes tipos celulares e material extracelular mineralizado, a matriz óssea (Sodek & McKee, 2000; Stevens & Lowe, 2001; Faloni, 2006; Robling et al., 2006; Junqueira, Carneiro, 2008).

Como elemento principal do esqueleto o tecido ósseo desempenha várias funções, entre as principais estão: dar suporte para tecidos moles, proteção de órgãos vitais, contenção da medula óssea, armazenagem e homeostase de cálcio e proporciona também apoio aos músculos esqueléticos (Valério, 2005; Robling et al., 2006; Datta et al., 2008; Fukumoto & Martin, 2009; Silva, 2011).

O tecido ósseo macroscopicamente pode ser dividido em dois tipos: o osso cortical (compacto) ou esponjoso (trabecular). O osso cortical é mais denso e espesso, e apresenta uma estrutura ordenada. Já o osso esponjoso apresenta uma estrutura irregular e maior atividade metabólica que o osso cortical, é menos compacto e formado por placas que se conectam chamadas de trabéculas ósseas (Sommerfeldt & Rubin, 2001; Datta et al., 2008; Kierszenbaum & Tres, 2012). Apesar das diferenças observadas entre os dois tipos de tecido ósseo, ambos apresentam a mesma estrutura histológica básica (Datta et al., 2008, Kierszenbaum & Tres, 2012).

Nos ossos longos, as extremidades ou epífises são compostas por uma camada de osso compacto (cortical) e osso esponjoso (trabecular), que é encontrado em maior quantidade quando comparado ao osso cortical. Já a parte mais cilíndrica dos ossos longos, denominada diáfise, é constituída principalmente por osso compacto e apresenta uma pequena quantidade de osso esponjoso onde o canal medular é delimitado, abrigando a medula óssea (Junqueira & Carneiro, 2012).

Todos os ossos são revestidos por membranas conjuntivas denominadas endóstio (interna) e perióstio (externa), que possuem células osteogênicas. Essas membranas são de suma importância para a integridade dos ossos (Katchburian & Arana, 2004; Datta et al., 2008; Junqueira & Carneiro, 2012).

A classificação histológica do tecido ósseo pode ser realizada de acordo com a organização das fibras colágenas. O tecido ósseo primário ou imaturo apresenta fibras colágenas dispostas de maneira irregular e sem orientação definida. Já o tecido ósseo secundário ou lamelar apresenta fibras colágenas de maneira organizada em lamelas paralelas, ou em camadas concêntricas, formando os sistemas de Harvers (Sommerfeldt & Rubin, 2001). No processo de formação óssea ocorre primeiro a produção de osso imaturo, e em seguida ocorre a substituição do mesmo por osso secundário (Shapiro, 2008).

Os principais tipos celulares que constituem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, responsáveis pela síntese de matriz óssea (osteóide), manutenção da matriz mineralizada e reabsorção óssea respectivamente (Katchburian & Arana, 2004; Kierszenbaum, 2004) (figura 1).

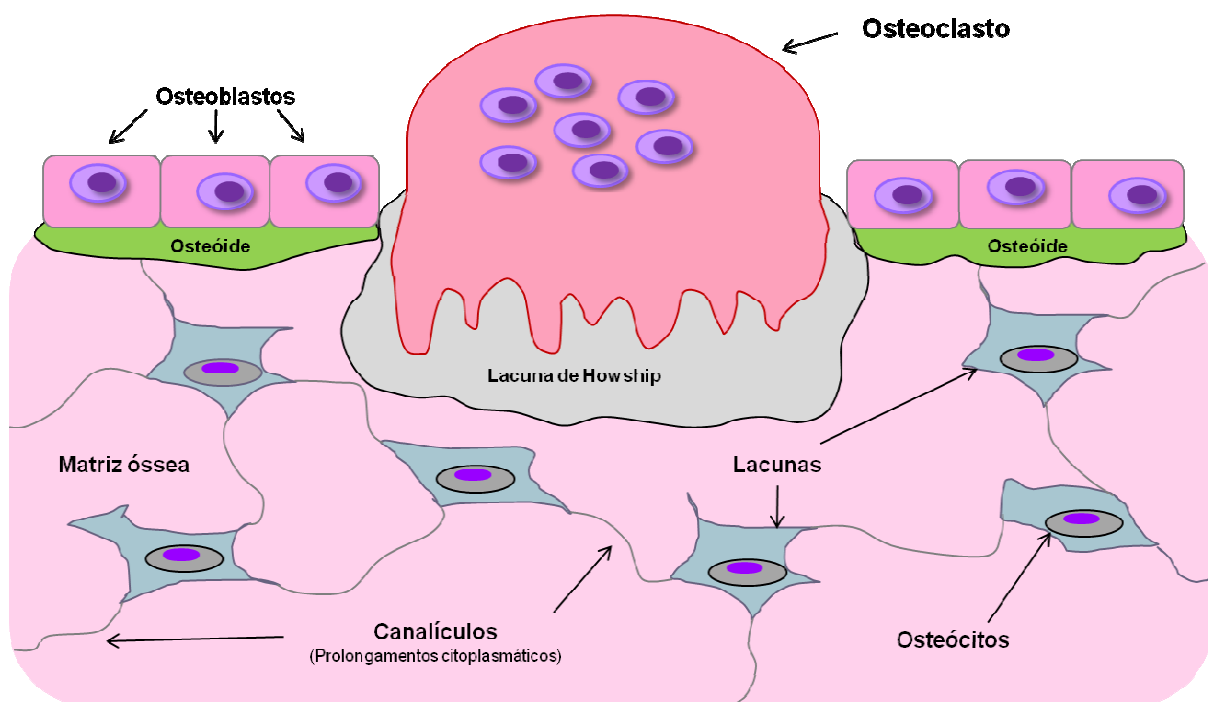


Figura 1. Esquema ilustrativo das células que constituem o tecido ósseo. Na superfície estão os osteoblastos em atividade sintetizando o osteóide e o osteoclasto localizado na lacuna de Howship degradando a matriz. Os osteócitos encontram-se aprisionados na matriz dentro de lacunas e realizam comunicação entre si por meio dos seus prolongamentos citoplasmáticos que se localizam no interior dos canalículos (Adaptado de Pacheco-Costa, 2010).

Dentre as especialidades do tecido ósseo está à capacidade de realizar a transdução dos estímulos mecânicos em uma resposta celular através de um processo referido como mecanotransdução (Warden et al., 2013), essencial para a homeostase óssea (Mikuni-Takagaki, 1999; Liedert et al., 2006).

A homeostase óssea é mantida pelo equilíbrio entre a formação óssea realizada pelos osteoblastos e a reabsorção óssea executada por osteoclastos. Esse equilíbrio é localmente regulado por citocinas e fatores de crescimento e sistematicamente por hormônios como, por exemplo, o paratormônio humano (PTH) e o estrógeno. Os osteoblastos também podem ser ativados diretamente por cargas mecânicas que levam ao aumento da proliferação e síntese da matriz, ou indiretamente ativados por fatores de crescimento e por liberação de prostaglandina e óxido nítrico pelos osteócitos (Mikuni-Takagaki, 1999; Liedert et al., 2006).

O tecido ósseo está em constante processo de remodelação, o que facilita o reparo de microlesões e também alterações na massa óssea em resposta a estímulos mecânicos ou necessidades metabólicas do mesmo (Liedert et al., 2006; Warden et al., 2013).

É sabido que em resposta ao aumento da carga mecânica (por exemplo, duração do exercício) o equilíbrio no turnover ósseo favorece o anabolismo, através do recrutamento e atividade dos osteoblastos o que resulta na deposição de matriz e consequentemente no aumento da resistência óssea. Porém, quando ocorre a diminuição da carga mecânica, a reabsorção é induzida promovendo a osteoclastogênese, enquanto a formação óssea é suprimida (Ozcivici et al., 2010). Apesar de alguns achados o mecanismo de mecanotransdução precisa ser melhor compreendido (Liedert et al., 2006; Warden et al., 2013).

1.2 Osteoblastos

Osteoblastos (figura 1) originam-se de células mesenquimais e também osteoprogenitoras e são as células responsáveis pela produção e secreção da matriz orgânica do tecido ósseo, sendo o colágeno do tipo I o elemento mais abundante (Kierszenbaum, 2004). Quando ativos encontram-se dispostos em uma camada contínua na superfície do osso e possuem formato cuboide, apresentam complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos devido sua função celular

na síntese de proteínas da matriz. Os osteoblastos não ativos são também chamados de células de revestimento ósseo, são achatados e lembram células osteoprogenitoras (Gartner & Hiatt, 1999; Ducy et al., 2000; Jayacumar & Silvio, 2010).

Dentre os fatores que atuam para estimular a diferenciação dos osteoblastos encontram-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), interleucinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado da insulina (IGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de transformação de crescimento β (TGF β) (Krane, 2005; Jayakumar & Silvio, 2011) e o fator de transcrição relacionado ao Runx 2 derivado das BMPs, que além dessa função, inibe a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos e adipócitos e também promove a diferenciação das células mesenquimais em células da linhagem osteoblástica (Harada & Rodan, 2003; Datta et al., 2008). Outro fator de suma importância que atua no aumento da diferenciação dessas células é o TGF- β 1, fator de crescimento e transformação, que estimula a aposição de matriz extracelular (Hock et al., 1990).

A principal função do osteoblasto é a síntese de matriz extracelular orgânica, podendo expressar também diversos marcadores como osterix, sialoproteína óssea (BSP), fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (Brendan et al., 2007). Possui importante função na regulação da formação de osteoclastos por meio dos receptores RANKL (Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ -B) e também pela síntese de osteoprotegerina (OPG) que é uma proteína ligante ao RANKL que impede a maturação dos osteoclastos (Brendan et al., 2007; Martin, 2013).

Além da síntese da matrix orgânica essas células atuam no processo de mineralização por meio da secreção da osteocalcina e da osteopontina, que são glicoproteínas necessárias para a ligação do cálcio e do colágeno a hidroxiapatita (Jayacumar & Silvio, 2010).

Para o início da mineralização da matriz osteóide é necessário à presença de vesículas da matriz que se desenvolvem na superfície dos osteoblastos e são liberados para o meio extracelular (Katchburian & Arana, 2004). Quando os osteoblastos ficam aprisionados na matriz recém-sintetizada passam a ser chamados de osteócitos. Em seguida, ocorre a deposição de matriz em torno do corpo da célula e de seus prolongamentos, dando origem as lacunas e aos canalículos (Bonewald, 2007; Datta et al., 2008; Noble, 2008).

O osteoblasto apresenta receptores que interagem com o paratormônio humano (PTH) e a prostaglandina que aumentam a atividade dos osteoclastos por meio da via adenil ciclase, e também receptores para Vitamina D₃, hormônio do crescimento (TGF), glicocorticóides, prostaglandina e estrógeno. A prostaglandina e o PTH aumentam a atividade dos osteoclastos por meio da via adenil ciclase. Os glicocorticóides inibem a síntese de proteínas produzidas pelo osteoblasto. Já a vitamina D₃ 1,25 (1 α ,25-di-hidroxicolecalciferol) estimula a produção de fosfatase alcalina, e proteínas específicas como a osteocalcina (Leaffer et al., 1995; Silvestrini et al., 1998; Miao & Scutt, 2002). O estrógeno, entretanto, inibe a ativação da adenil ciclase e aumenta os níveis de RNAm da fosfatase alcalina, atuando assim na formação e reabsorção óssea (Väänänen, 2005).

1.3 Osteócitos

Os osteócitos (figura 1) são células com prolongamentos citoplasmáticos que se encontram aprisionados no interior da matriz óssea. Conforme ocorre a deposição de osteóide e calcificação da matriz, o osteoblasto fica enclausurado em uma lacuna, levando há uma diminuição no seu metabolismo celular resultando em pouco retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi reduzido e cromatina condensada, o que dá a forma achatada ao núcleo (Gartner & Hiatt, 1999; Bonewald, 2008; Noble, 2008). Os prolongamentos citoplasmáticos, localizados no interior dos canalículos realizam comunicação entre si por meio da junção Gap, no qual formam uma rede de comunicação, por onde circulam íons, pequenas moléculas, nutrientes e metabólitos que realizam a manutenção óssea (Raisz & Rodan, 1998; Gartner & Hiatt, 1999; Katchburian & Cerri, 2002; Noble et al., 2002; Andia et al., 2006; Bonewald, 2008).

Estudos têm mostrado que o osteócito está envolvido na regulação da atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos (Klein-Nulend et al., 1995; Bacabac et al., 2004; Tan et al., 2007), dentre estas funções estão a formação óssea, a mineralização local e sistêmica e a reabsorção óssea (Klein-Nulend et al., 1995; Jilka et al., 1999; Boabaid et al., 2001; Andia et al., 2006; Bacabac et al., 2004; Tan et al., 2007).

O processo de remodelação óssea é fisiológico e constante (Feng & McDonald, 2011) no qual a taxa de formação é correspondente à taxa de reabsorção e sua regulação é realizada por diversos fatores, como mecanismos regulatórios intercelulares, hormonais, fatores locais e externos. Quando alterações acontecem durante esse processo podem resultar em alguns distúrbios, entre eles está osteoporose (Amadei et al., 2006). A remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), que tem como característica o acoplamento das funções osteoblásticas e osteoclásticas (Emerton et al., 2010).

O sinal que inicia o processo de remodelação óssea não está bem claro, entretanto evidências indicam que forças mecânicas podem ser capazes de promover alterações na arquitetura óssea (Junqueira & Carneiro, 2008). A tensão mecânica regula vários sinais moleculares produzidos por osteócitos, incluindo óxido nítrico, prostaglandinas e esclerostina que podem influenciar na formação e reabsorção óssea (Forwood, 1996; Włodarski et al., 2013).

Quando o osso sofre microlesões, os osteócitos próximos deste local entram em processo de morte celular e liberam sinalizações para que os osteoclastos sejam atraídos até o local da lesão, iniciando assim o processo de reabsorção óssea (Bentolila et al., 1998; Verborgt et al., 2002).

No entanto, enquanto a morte do osteócito parece ser um pré-requisito importante para o início da reabsorção óssea, não é sabido se os osteócitos apoptóticos são os responsáveis por produzir sinais pró-osteoclastogênicos como o RANKL (Boabaid et al., 2001; Fisher, 2004; Kennedy et al., 2012). A morte celular de osteócitos localizados próximos de lesões tem sido correlacionada com o aumento da remodelação óssea devido ao aumento na produção de RANKL e ao aumento da formação de osteoclastos, ou seja, os osteoclastos migram até o local da lesão e iniciam a reabsorção óssea (Bentolila et al., 1998; Verborgt et al., 2002; Kular et al., 2012).

Estudos sugerem que quando a remodelação óssea é aumentada em resposta ao RANKL os mecanismos de acoplamento de maneira isolada não são suficientes para manter o equilíbrio na remodelação, e que outros mecanismos como a supressão do antagonista da via Wnt, a esclerostina, são necessários para aumentar a formação óssea e manter o equilíbrio (Xiong & O'Brien, 2012). A esclerostina é um

regulador negativo da formação óssea sendo expressa exclusivamente por osteócitos, diminuindo a formação óssea através da inibição da diferenciação dos osteoblastos, porém o mecanismo pelo qual a esclerostina regula a formação óssea é desconhecido (van Bezooijen et al., 2004). Assim os osteócitos mostram-se capazes de controlar a remodelação e intensidade da formação óssea, revelando sua capacidade de atender necessidades específicas (Xiong, O'Brien, 2012).

A inibição da apoptose de osteócitos previne a reabsorção intracortical em resposta as microfissuras, sugerindo que o processo de apoptose controla o recrutamento de osteoclastos para a área danificada (Kular et al., 2012). Consistente com essa ideia, Tatsumi e colegas (2007) demonstraram que a apoptose dos osteócitos está associada com o aumento na produção de RANKL, porém a fonte celular produtora de RANKL não foi determinada. Logo, o osteócito tem sido considerado elemento essencial para a manutenção e remodelação do tecido ósseo (Jilka et al., 1999; Boabaid et al., 2001; Andia et al., 2006).

1.4. Osteoclastos

Os osteoclastos (figura 1) são as células responsáveis por degradar a matriz óssea mineralizada. São móveis, gigantes, multinucleadas, formadas por fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética (Sodek & McKee, 2000). Apresentam tamanho variado entre 50 a 100µm (Manolagas, 2000), contendo de 5 a 8 núcleos em média, com tamanho e formas variadas (Väänänen, 2005). Estão localizados em cavidades onde ocorre a reabsorção óssea, denominadas de lacunas de Howship. Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exhibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova (Suda et al., 1997; Raisz & Rodan 1998).

Periféricamente a esta borda em escova há uma região do citoplasma que se assemelha a uma faixa diretamente apoiada na matriz óssea denominada de zona clara, desprovida de organelas e rica em actina e miosina estando intimamente aderida à superfície do tecido ósseo podendo ser responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea delimitando desta forma a borda em escova, compartimento onde ocorre a desmineralização bem como a degradação da matriz do tecido ósseo

(Manolagas, 2000; Sodek & McKee, 2000; Katchburian & Cerri, 2002; Suda & Takahashi, 2008; Silva, 2011; Martin, 2013).

Este compartimento cria um microambiente propício para a liberação e atividade das enzimas proteolíticas do osteoclasto, que junto com a geração de prótons pela enzima anidrase carbônica, promove um ambiente ácido onde ocorre a desmineralização da matriz (Manolagas, 2000; Sodek & McKee, 2000; Katchburian & Cerri, 2002), em um ambiente com o pH adequado para que a dissolução do mineral seja realizada de maneira correta pela catepsina K (Martin, 2013). As metaloproteinases da matriz, que podem ser ativadas em ambientes ácidos, também têm sido observadas nas lacunas de reabsorção e podem contribuir para a degradação da matriz óssea (Sodek & Overall, 1992; Katchburian & Cerri, 2002).

A diferenciação dos precursores dos osteoclastos na medula óssea é induzida por uma variedade de fatores, que incluem várias citocinas chaves (Boyce et al., 2012). Um dos principais elementos dessa ação é o receptor ativador do fator nuclear κ -B (RANK), expressado nas superfícies dos precursores de osteoclastos e também nos osteoclastos maduros em resposta a uma variedade de influências, que incluem diversos fatores de transcrição (Mellis et al., 2011), citocinas e o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (M-CSF), produzido por células osteoblásticas na medula óssea (Asagiri et al., 2005; Mellis et al., 2011).

A osteoclastogênese em particular é regulada por três membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF); RANK, RANKL e a osteoprotegerina (Tabari et al., 2013). O processo de diferenciação celular é iniciado quando o receptor RANK presente no monócito se une ao ligante RANKL expressado pelos osteoblastos. Os osteoblastos expressam duas citocinas essenciais para a osteoclastogênese, o M-CSF e o RANKL (Horton, 1999; Nakamura et al., 2003; Martin, 2013).

Os osteoblastos produzem também OPG, um receptor chamariz para o RANKL, que atua inibindo a interação entre RANKL e RANK limitando a formação de osteoclastos, fator esse que determina a extensão da proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos (Horton, 1999; Nakamura et al., 2003; Martin, 2013). Fatores estimulantes da reabsorção óssea atuam nos osteoblastos para regular a expressão de RANKL e OPG. O fator nuclear de células T ativadas (NFATc1) é um fator de transcrição importante para a diferenciação dos osteoclastos, responsável pela expressão da proteína transmembrana dendrítica específica (DC-

STAMP), necessária para a fusão desses precursores (Vignery, 2005; Kim et al., 2006) (Figura 2).

O processo de maturação dos osteoclastos é concluído a partir do momento em que a borda em escova e zona clara são formadas, e quando a lacuna de Howship adere o osteoclasto ao tecido ósseo (Zou et al., 2007; Faloni, 2010; Kierszenbaum & Tres, 2012).

A reabsorção óssea excessiva realizada pelos osteoclastos desempenha papel central na patogênese da perda óssea relacionada com a idade e também na deterioração microestrutural o que leva a fragilidade e fraturas ósseas (Furuya et al., 2011).

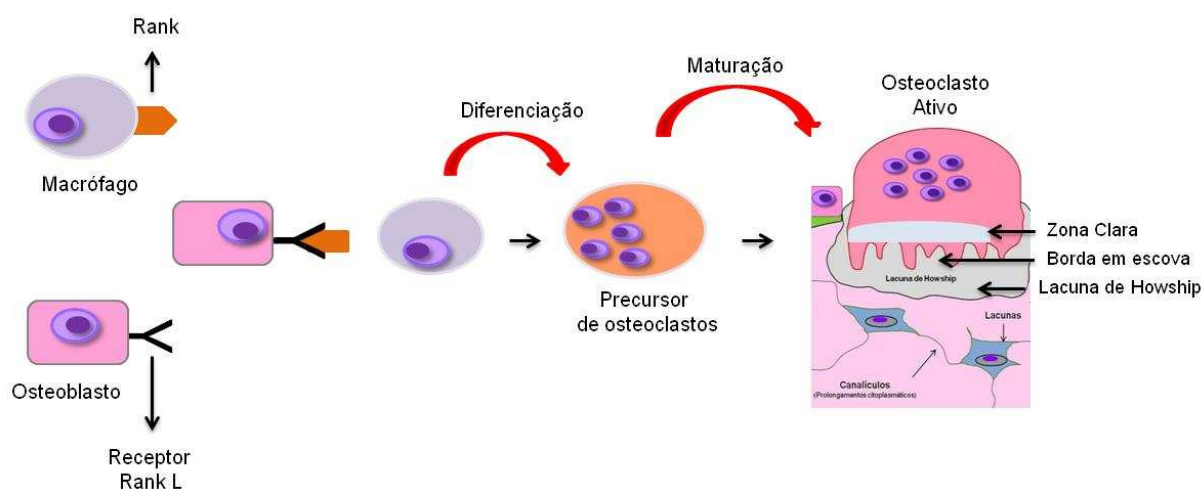


Figura 2. Esquema ilustrativo dos estágios de diferenciação da linhagem osteoclástica. O macrófago contendo o RANK se une ao RANKL presente nos osteoblastos dando início ao processo de diferenciação. Em seguida, outros monócitos são atraídos pelo monócito basal formando o precursor multinucleado, que sofre maturação quando encontra a superfície óssea e desenvolve a zona clara, a borda pregueada e a lacuna de Howship (Adaptado de Campos, 2013).

1.5 Matriz óssea

A matriz óssea é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os componentes orgânicos as fibras colágenas estão presentes em maior quantidade e são formadas pela proteína colágeno. Em colorações com hematoxilina e

eosina (H.E.) as fibras de colágeno aparecem coradas em rosa (Junqueira & Carneiro, 2008). Entre os tipos de colágeno, o tipo 1 é o mais abundante no tecido ósseo ocupando a maior parte da matriz orgânica. Também estão presentes os colágenos dos tipos III, V, X e XI, que desempenham funções estruturais dando ao tecido ósseo maior rigidez e elasticidade (Sodek & Mackee, 2000; Junqueira & Carneiro, 2008). Já a parte orgânica não colágena é formada por osteonectina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, decorin, biglican, fosfoproteínas, proteoglicanos, glicoproteínas, BMPs, alguns lipídios e fatores de crescimento (Sommerfeldt & Rubin, 2001; Young, 2003; Katchburian & Arana, 2004).

Os componentes citados anteriormente participam de diversas atividades em relação à estrutura, diferenciação, proliferação e adesão celular. A osteocalcina atua inibindo a função dos osteoblastos e também está presente nos tecidos que sofrem remodelação (Gundberg, 2003; Katchburian & Arana, 2004; Alford & Hankenson, 2006). A osteonectina é a proteína não colágena mais abundante do tecido ósseo mostrando afinidade com o colágeno e a hidroxiapatita, permitindo a ligação entre a porção mineral e a parte orgânica da matriz óssea (Termine et al., 1981; Faloni, 2006).

Os componentes inorgânicos mais abundantes da matriz são os íons cálcio e fósforo, mas existem também o sódio, bicarbonato, magnésio, potássio, cloreto, flúor e citrato, porém em menores quantidades (Katchburian & Arana, 2004). O cálcio e fósforo associam-se formando um cristal semelhante às apatitas naturais e por ser hidratado recebe o nome de hidroxiapatita. A combinação entre a hidroxiapatita e as fibras colágenas é responsável por dar ao tecido ósseo dureza e resistência (Datta, et al., 2008).

Os osteoblastos sintetizam e secretam o colágeno na forma de procolágeno assim como em outros tecidos conjuntivos, para em seguida liberá-lo na matriz extracelular onde serão polimerizados para dar origem as fibras colágenas (Junqueira & Carneiro, 2008). As fibras colágenas são constituídas por 3 cadeias polipeptídicas no formato de uma tripla hélice e, essa estrutura protéica justifica a rigidez, solidez e estabilidade do colágeno (Kierszenbaum, 2004).

O processo de mineralização do tecido desencadeia vários eventos na matriz como o aumento da concentração de Ca^{+2} e Po_4^{-3} (íons fosfato) para que a osteocalcina se ligue aumentando a concentração de Ca^{+2} na matriz, assim quando o

osteoblasto sintetizar o osteóide vesículas que contém enzimas como a fosfatase alcalina e pirofosfatase alcalina (remove os íons Po_4^{-3}), dará início a precipitação da hidroxiapatita aumentará a concentração de minerais (Stevens & Lowe, 2001; Clarke & Anderson, 2003).

Encontram-se presentes também na matriz óssea as glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos ocupando os espaços ao redor das fibras de colágeno e dos cristais de hidroxiapatita (Kierszenbaum, 2004). Os proteoglicanos promovem a fusão das fibras de colágeno e suas conexões com os cristais de minerais (Pins, 1997).

Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídeas repetidas de ácido hexurônico (ácido L-idurônico ou D-glicurônico) e hexosamina (D-glicosamina ou D-galactosamina), onde os principais GAGs sulfatos são o dermatam sulfato, condroitim sulfato, queratam sulfato e heparam sulfato e o GAG não sulfatado denominado ácido hialurônico (Kierzenbaum, 2004; Junqueira & Carneiro, 2008; Salbach et al., 2012).

O condroitim e o dermatam sulfato possuem capacidade de reter íons de Na^+ e água devido a sua alta eletro negatividade, além da capacidade de se ligar a outras proteínas e formar proteoglicanos (Gundberg, 2003). Podem também aumentar a atividade da catepsina K que atua na degradação do colágeno, enquanto o dermatam e o heparam podem inibir essa atividade (Nikitovic et al., 2005; Lamoureux et al. 2007).

O ácido hialurônico (AH) pertence ao grupo não sulfatado e tem propriedades únicas como não se ligar a outras proteínas, apresenta funções homeostáticas, com capacidade de solubilidade, bem como a de absorção de água (Price et al., 2007). Esse GAG pode ser facilmente encontrado no processo de mineralização, pois tem papel fundamental na modulação da deposição de minerais, sendo menos encontrado no osso maduro (Bastow et al., 2008). Além disso, há uma migração do AH em processos de cicatrização e reparos teciduais (Fraser et al., 1997; Bastow et al., 2008; Merli et al., 2012) e com base no seu peso molecular é possível indicar sua função no tecido (Bollyky et al., 2007). O AH de alto peso molecular esta relacionado ao papel antiinflamatório, antiangiogênico, lubrificação das articulações, regulação osmótica e suporte ao reparo tecidual (Brown et al., 1991; Deed et al., 1997; Noble, 2002). Todavia, quando o AH encontra-se fragmentado em infecções e lesões

teciduais apresenta baixo peso molecular, e age como angiogênico e proinflamatório (Horton et al., 1999; Termeer et al., 2002).

No tecido ósseo, há evidências de que o ácido hialurônico possa estar envolvido no processo de reabsorção óssea (Prince, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* tem relatado que o tratamento com paratormônio (PTH) estimula a síntese de ácido hialurônico com subsequente aumento na reabsorção óssea (Johnston et al., 1972; Luben et al., 1974), o que sugere uma relação entre a síntese de ácido hialurônico e a atividade dos osteoclastos.

1.6 Osteoporose

A organização Mundial de Saúde define osteoporose como uma desordem esquelética caracterizada por redução da massa óssea com alterações da microarquitetura do tecido levando a uma redução da resistência óssea e ao aumento da suscetibilidade a fraturas (Bennell et al., 2000; Bone et al., 2008; Khajuria et al., 2011; Saidak & Marie, 2012). Em consequência dessas alterações, fraturas osteoporóticas resultam em complicações secundárias, como perda funcional, aumento no tempo de permanência do paciente internado, que podem resultar em elevados gastos médicos e na dependência de outros indivíduos (Mark et al., 1999; Oleksik et al., 2005).

Os dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostram que 10% da população brasileira tem idade igual ou superior a 60 anos, já a Organização Mundial da Saúde – OMS projeta que de 1950 a 2025 o número de idosos no país terá um aumento de quinze vezes e, a população atual em cinco vezes. Após a apresentação desses dados, estima-se que o Brasil ocupará o 6º lugar quanto ao número de idosos, alcançando no ano de 2025 trinta e dois milhões de pessoas na faixa etária de 60 anos ou mais (OMS, 2006; IBGE, 2010).

Na cidade de São Paulo, um estudo realizado com 207 mulheres e 94 homens acima de 65 anos, demonstrou que 92,8% das mulheres apresentavam osteopenia e/ou osteoporose em pelo menos um local do sistema esquelético analisado (Camargo et al., 2005). Estudo aponta que cerca de 15 a 30% dos pacientes que sofreram fraturas vão a óbito durante o primeiro ano do evento, devido a complicações provocadas por fraturas como: inflamações, dificuldade de recuperação e

trombozes, normalmente decorrentes da idade avançada (Pinheiro, 2008). Segundo Wark (1999), em 2050 poderá haver aproximadamente 6,3 milhões de fraturas por ano, sendo a Ásia e América Latina os locais com maior incidência.

A ocorrência da osteoporose está relacionada principalmente a pessoas idosas e, sobretudo mulheres após a menopausa devido à insuficiência do hormônio estrógeno. Esse hormônio apresenta grande importância para a homeostase do tecido ósseo, visto que a queda nas taxas desse hormônio está relacionada à ocorrência da osteoporose (Sowers et al., 1998; Riggs, 2000). A deficiência estrogênica promove perda de massa óssea em decorrência do desequilíbrio da remodelação óssea, a qual determina maior reabsorção em relação à neoformação óssea (Manolagas, 2000; Cohen, 2006). Este fato pode ter como consequência um quadro inicial de osteopenia e posteriormente uma progressão para a osteoporose (Kribbs et al., 1983; Jeffcoat, 2005).

É sabido que o estrógeno atua sobre o sistema RANK/RANKL/OPG (receptor ativador de fator nuclear- κ B/Ligante de RANK/osteoprotegerina), relacionado à formação dos osteoclastos (Gallagher, 2008; Väänänen & Laitala-Leinonen, 2008). Ao agir sobre este sistema, o estrógeno estimula o aumento da OPG secretado pelos osteoblastos e interrompe a ligação RANK-RANKL, inibindo a diferenciação dos precursores de osteoclastos (Gallagher, 2008). Sendo assim, a redução desse hormônio em mulheres após a menopausa é um dos principais fatores de desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Na sua ausência a quantidade de osteoclastos aumenta, havendo desequilíbrio entre a formação e a reabsorção (Väänänen & Laitala-Leinonen, 2008).

As drogas utilizadas para o tratamento da osteoporose além do cálcio e vitamina D, incluem os medicamentos de ação anti-reabsortiva, tais como; o estrógeno, raloxifeno, alendronato, bifosfonatos, calcitocina e o denosumabe que atuam na diminuição da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (Brixen et al., 2004; Bone et al., 2004) e de ação anabólica como por exemplo a teriparatida ou PTH humano (1-34) [hPTH (1-34)] que opera aumentando a formação óssea (Dempster et al., 2001; Rubin & Bilezikian, 2005), e o ranelato de estrôncio com dupla ação no tecido ósseo, tanto anti-reabsortivo como anabólico (Marie et al., 1985; Marie et al., 1986; Meunier et al., 2004; Reginster et al., 2005; Meunier et al., 2009).

1.7 Ranelato de estrôncio

O ranelato de estrôncio (SrR) ou PROTOS[®] como é conhecido na indústria farmacêutica é desenvolvido pelos laboratórios Servier (França), aprovado na Europa para o tratamento da osteoporose pós-menopausa, e é constituído por 2 átomos de estrôncio estáveis e 1 molécula de ácido ranélico (Meunier et al., 2004; Reginster et al., 2005; Meunier et al., 2009).

Trabalhos na literatura apontam o ranelato de estrôncio como uma proposta para o tratamento da osteoporose pelo fato dessa droga exercer efeito tanto antireabsortivo quanto anabólico no tecido ósseo (Marie et al., 1985; Meunier et al., 2004; Meunier et al., 2009; Campos, 2013).

In vitro, o ranelato de estrôncio aumenta a formação óssea por replicação pré osteoblástica, diferenciação e atividade dos mesmos (Canalis et al., 1996; Bonnelye et al., 2008), o que leva ao aumento da síntese de matriz (Saidak & Marie, 2012), e também na diminuição da reabsorção óssea por inibir a diferenciação, atividade e também estimulando a apoptose dos osteoclastos (Bonnelye et al., 2008; Habermann et al., 2010; Saidak & Marie, 2012).

Em 2004 o ranelato de estrôncio foi aprovado para o tratamento da osteoporose com renovação obtida em 2009 após três grandes estudos (STRATOS, SOTI E TROPOS) que demonstraram a eficácia desse medicamento na prevenção de fraturas em mulheres pós-menopausa (Meunier et al., 2004; Reginster et al., 2005; Meunier et al., 2009).

O primeiro grande estudo foi o STRATOS (Strontium Ranelate for Treatment of Osteoporosis) realizado com 353 mulheres, pós menopausadas e osteoporóticas de 9 países da Europa e que tinham em seu histórico pelo menos uma fratura vertebral diagnosticada. Estas, foram divididas em um grupo placebo e outros 3 grupos que receberam diferentes doses de ranelato de estrôncio: 0,5g, 1g, 2g de SrR por dia. Depois de 2 anos consecutivos de tratamento, os pesquisadores constataram independente da dose, aumento da densidade mineral óssea (DMO) na coluna vertebral e no colo dos fêmures, diminuição do risco de fraturas vertebrais nos grupos 0,5g e 2g de SrR, porém só o grupo tratado com a maior dose de estrôncio mostrou aumento da fosfatase alcalina e menor secreção de NTX piridinolina, marcadores relacionados a formação e reabsorção óssea respectivamente (Meunier et al., 2002; Stepan, 2013).

O estudo SOTI (Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention) foi realizado durante 3 anos com 1.649 mulheres pós menopausadas e osteoporóticas tratadas com 2g de SrR por dia. Ao término do tratamento foi observada a redução de 41% no risco de novas fraturas vertebrais, aumento de 14,4% da densidade mineral óssea na coluna lombar e 8,3% no colo do fêmur (Meunier et al., 2004; Hamdy, 2009; Stepan, 2013).

O terceiro grande estudo foi denominado de TROPOS (Treatment of Peripheral Osteoporosis) e realizado com 5.091 mulheres pós menopausadas e osteoporóticas em 11 países da Europa e 1 da Oceania, que receberam a mesma dose diária de 2g de ranelato de estrôncio durante 5 anos. Foi observado no terceiro ano de tratamento a diminuição em 36% do risco de novas fraturas no quadril e a densidade mineral óssea das vértebras L2 e L4 continuaram a aumentar em $1,2 \pm 5,8\%$ no quinto ano de tratamento (Reginster et al., 2005; Meunier et al., 2009; Hamdy, 2009).

Após estes estudos outras pesquisas foram desenvolvidas. Boivin et al. 2010 avaliaram biópsias coletadas durante os 5 anos em que se estenderam os estudos STRATOS, TROPOS e SOTI e constataram que o SrR incorporado pelo osso só estava presente no tecido ósseo recém depositado, resultante da atividade de formação durante o período de tratamento.

Biópsias que foram obtidas dos estudos TROPOS e SOTI de 3 anos de tratamento com SrR analisaram os cristais de hidroxiapatita e não foram encontradas diferenças na estrutura destes cristais na avaliação entre os grupos ranelato de estrôncio e placebo (Doublier et al., 2012). Estudos *in vitro* mostraram que o sal de estrôncio estimula parâmetros de formação óssea em roedores e humanos, resultando no aumento do volume ósseo trabecular (Canalis et al., 1996; Bonnelye et al., 2008).

Pertencente à família dos metais alcalinos terrosos, o estrôncio é absorvido pelo intestino através do mesmo mecanismo do cálcio, já o ácido ranélico não é absorvido e é rapidamente eliminado por via renal (Comar & Wasserman, 1957; Dahl et al., 2001). Quando o tratamento com SrR é indicado, o consumo de alimentos que contem cálcio deve ser evitado ou ingerido 3 horas antes da administração da droga devido a afinidade que o estrôncio tem pelo tecido ósseo (Likins et al., 1959; Protos[®] 2g, 2012), agindo na mesma via do cálcio (Johnson et al., 1968; Chattopadhyay et al., 2007; Brennan et al., 2009).

Existem dois principais mecanismos conhecidos pelo qual o ranelato de estrôncio é incorporado, por troca de superfície e substituição iônica (troca difusa). Através da troca de superfície que é realizada diretamente entre o sangue e o osso, pode ocorrer em todos os locais onde a superfície do tecido ósseo entre em contato com o sangue. O processo de incorporação é rápido e dependente da atividade dos osteoblastos e do cálcio no osso (Boivin et al., 1996; Dahl et al., 2001). A troca iônica ou difusa é mais lenta e o estrôncio é interiorizado para a rede de cristais presente no osso mineralizado (MacDonald et al., 1951; Dahl et al., 2001).

Essa distribuição pode ser explicada pelo fato de que no osso recém-sintetizado, o SrR é incorporado em novos cristais minerais (substituições heteroiônicas) e é fixado sobre a superfície dos cristais, enquanto que no osso velho o SrR é fixado principalmente por troca ou adsorção, com mínima substituição heteroiônica (Boivin et al., 1996).

A droga é absorvida de três a cinco horas após a ingestão e atinge a estabilidade no organismo depois de duas semanas de tratamento contínuo, e possui biodisponibilidade de 25% em uma dose habitual de 2g e meia vida de 60 horas (Dahl et al., 2001; Protos[®] 2g, 2012). A maior parte do estrôncio concentra-se no osso e sua excreção é realizada pelos rins, sendo mais rápida do que a excreção do cálcio, independente da dose e do período de tratamento (Comar & Wasserman, 1957; Spencer et al., 1957; Mazzuoli et al., 1958).

Em 1996 Canalis et al. verificaram que o sal de estrôncio aumentava a formação óssea e a síntese do colágeno *in vitro*, e concluíram que esse efeito poderia estar relacionado ao aumento de precursores dos osteoblastos. O que foi confirmado posteriormente com trabalhos *in vitro* que envolveram o SrR, onde foi observado que a diferenciação e maturação dos osteoblastos é por ativação do gene Cn-NFATc1, aumento da expressão dos marcadores: BSP, ALP e OCN; e aumento da síntese de colágeno tipo I, dessa forma ele atua potencializando a diferenciação e aumento da atividade dos osteoblastos (Barbara et al., 2004; Bonnelye et al., 2008; Fromigué et al., 2010) sem afetar a mineralização da matriz (Hamdy, 2009).

O SrR atua também nos precursores dos osteoblastos induzindo a expressão do gene cyclooxygenase-2 (COX-2) e consequente aumento da produção da prostoglandina E₂ (PGE₂) que estimula a formação de nódulos em culturas de osteoblastos e no osso cortical e trabecular *in vivo* (Choudhary et al. 2007). Além disso,

estudos tem mostrado que há uma redução da apoptose nos osteoblastos e um aumento da expressão de esclerostina, um marcador da diferenciação de osteoblasto para osteócito (Atkins et al., 2009; Marie et al., 2011).

O SrR é capaz de diminuir a diferenciação e atividade dos osteoclastos *in vitro*, demonstrado pela redução na expressão dos marcadores, assim como sua função e a ruptura do citoesqueleto presente, elementos essenciais para a atividade reabsortiva (Takahashi et al., 2003; Cianferotti et al., 2013). O principal mecanismo pelo qual o ranelato de estrôncio inibe a atividade osteoclástica *in vitro* é por aumentar a secreção de OPG e reduzir a expressão do RANKL pelos osteoblastos (Atkins et al., 2009; Brennann et al., 2009; Cianferotti et al., 2013). De fato, o sistema OPG/RANKL desempenha um papel chave na diferenciação osteoclástica, sendo o aumento da OPG considerado o maior mediador do efeito desacoplador (figura 3) no metabolismo ósseo realizado pelo ranelato de estrôncio, como demonstrado *in vitro* e subsequentemente em estudos *in vivo* (Saidak & Marie, 2012; Cianferotti et al., 2013). O SrR diminui também a atividade de reabsorção óssea por meio da ruptura dos filamentos de actina presentes na zona clara dos osteoclastos e induz a apoptose por meio do receptor sensível ao cálcio (CaR) presente nos osteoclastos (Bonnelye et al., 2008; Brennan et al., 2009; Hamdy, 2009; Hurtel-Lemaire et al., 2009; Caudrillier et al., 2010).

Segundo achados recentes de estudos *in vitro*, foi observado que a presença de OPG é maior em mulheres na pós-menopausa que foram tratadas com ranelato de estrôncio nos 3 primeiros meses após o início do tratamento e até o 3º ano (Reginster et al. 2012; Cianferotti et al., 2013).

As células do tecido ósseo ancoram o receptor sensível ao cálcio (CaSR), que está acoplado a proteína G e tem sua ativação mediada por cátions bivalentes, como o cálcio extracelular e os que apresentam afinidade baixa como o estrôncio. A sinalização do CaSR tem demonstrado desempenhar papel fundamental na mediação da modulação do sistema OPG/RANKL por ranelato de estrôncio. No entanto, uma vez que os osteoblastos desprovidos de CaSR ainda possam responder ao SrR em termos de proliferação e apoptose, outras moléculas sensíveis ao cátion e diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos na mediação dos efeitos do SrR em células ósseas (Fromigué et al. 2010; Cianferotti et al., 2013).

A grande maioria dos estudos que envolvem o ranelato de estrôncio são clínicos ou *in vitro*, e mostram a eficácia desta droga no aumento de massa óssea, mas

alguns pesquisadores admitem que existe a necessidade de mais estudos para elucidar seus mecanismos de ação e seus efeitos no tecido ósseo (Meunier et al., 2004; Reginster et al., 2005; Bonnelye et al., 2008; Brennan et al., 2009).

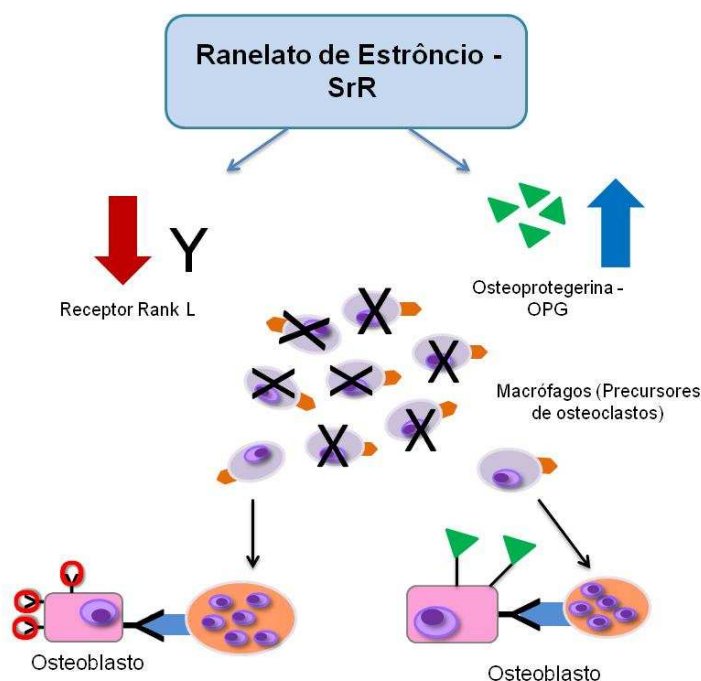


Figura 3. Esquema demonstrando os mecanismos de ação do Ranelato de Estrôncio (SrR) (Adaptado de Campos, 2013).

1.7.1. Estudos em modelos animais

Estudos em ratos intactos, macacos, ratas ooforectomizadas e modelos animais com osteoporose induzida por imobilização mostraram que o SrR é capaz de aumentar a massa óssea, conteúdo mineral e a força óssea enquanto melhora a microarquitetura (Cianferotti et al., 2013).

Em animais um dos primeiros estudos com SrR foi realizado por Marie et al. (1993) que verificaram a ação do ranelato de estrôncio no tratamento preventivo da perda óssea em ratas *Sprague-Dawley* com 3 meses de idade, ooforectomizadas e tratadas imediatamente com as doses de 77, 154 e 308 mg/kg/dia por 3 meses. Ao final do tratamento foi observado que o SrR preveniu parcialmente e de modo dose dependente a perda do volume ósseo trabecular em tíbias.

Buehler et al. (2001) utilizaram 47 macacos adultos (machos e fêmeas) com idades entre 3 a 4 anos, submetidos ao tratamento com SrR por 6 meses com doses de 100, 275, e 750 mg/kg/dia, e verificaram que os índices de reabsorção óssea diminuíram enquanto a formação óssea foi mantida (preservada) durante o processo de remodelação do osso alveolar após o tratamento com SrR.

Em 2009, Bain e colaboradores observaram em ratas ooforectomizadas tratadas com diferentes doses de SrR (125, 250, 625mg/kg/dia) aumento da resistência óssea na dose de 625mg/kg/dia e também prevenção da perda e deterioração da microarquitetura óssea.

O estudo realizado por Hott et al. (2003) onde utilizaram ratos *Sprague-Dawley* machos como modelo de perda de massa óssea induzida por imobilização durante 10 dias, mostrou o aumento dos níveis de fosfatase alcalina e diminuição da excreção de hidroxiprolina urinária, respectivamente marcador específico de formação e de reabsorção óssea, entretanto a perda óssea foi suprimida no grupo que recebeu a dose 800mg/kg/dia.

Os efeitos do ranelato de estrôncio a longo prazo foram investigados por Ammann et al. (2004 e 2007) em ratos *Fisher* intactos, com idade entre 6 e 7 semanas tratados com diferentes doses de estrôncio (0, 225, 450 e 900 mg/kg/dia) durante 2 anos. Os autores observaram aumento na espessura do fêmur nas doses de 450 e 900mg/kg/dia, e correlacionado esse aumento com maior resistência óssea.

Ahmet-Camcioglu et al. (2009) constataram aumento da DMO no fêmur, nas vértebras e na região global de ratos fêmeas OVX. O tratamento foi realizado com uma alta dose de 1.800mg/kg/dia de SrR, logo após a cirurgia e teve duração de 2 meses.

No estudo realizado por Maimoun et al. (2010) utilizando implantes de titânio em tíbias de ratas *Sprague-Dawley* (6 meses de idade), tratadas com 625mg/kg/dia de SrR, foi verificado após o tratamento que a região trabecular apresentou maior resistência óssea e melhor integração entre o osso e o implante. É sabido que o ranelato de estrôncio melhora a resistência óssea, pelo fato de exercer efeito positivo na microarquitetura do tecido (Hamdy, 2009; Geoffroy et al., 2011; Boyd et al., 2011).

Em 2010, Li et al. observaram em ratos fêmeas osteopênicos com fraturas nas tíbias, o aumento do calo ósseo nos animais submetidos ao tratamento

com 625mg/kg/dia de SrR por 4 semanas, e a diminuição do calo ósseo nos animais tratados com a mesma dose, porém até 8 semanas.

Ao comparar o hPTH 1-34 (paratormônio humano sintético 1-34) com o ranelato de estrôncio na consolidação de fraturas em ratas OVX, Habermann et al. (2010) observaram que o SrR foi mais eficaz, aumentando o volume ósseo significativamente chegando a equiparar-se com o grupo Sham. As doses utilizadas correspondem às doses aplicadas na clínica, para que as comparações fossem realizadas de maneira correta, ou seja, 600mg/kg/dia para o SrR e 20mg/kg/dia para o hPTH 1-34.

Em relação ao uso do SrR, algumas reações clínicas adversas foram observadas e descritas, como dermatites, trombozes venosas, distúrbios gastrointestinais, náuseas e eritemas cutâneos de gravidade alta como a síndrome de DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic), conhecida também como Síndrome de Hipersensibilidade Sistêmica a Droga (SHD), descrita como uma reação incomum a medicamentos (Grosso et al., 2008; Ensina et al., 2009; Rizzoli et al., 2011).

Estudos com SrR realizados em modelos animais (tabela 1) têm sugerido a ação positiva deste tratamento na perda óssea, entretanto as doses utilizadas são diversas (Arlot et al., 1992; Marie et al., 1993; Bain et al., 2009; Li et al., 2010) e não há trabalhos relacionando os efeitos do SrR combinado a exercícios físicos no tecido ósseo de ratos adultos osteopênicos.

Tabela 1. Revisão da literatura. Trabalhos realizados com modelos animais utilizando Ranelato de Estrôncio

Ano	Autor	Modelo animal	Idade dos animais	Tempo de espera após ooforectomia	Período de tratamento (semanas)	Doses
1985	Marie et al.	Ratos Sprague-Dawley	adultos	não submetidos	9 semanas	0, 19, 0,27, 0,34 e 0,40%
1993	Marie et al.	Ratos - Sprague-Dawley	3 meses	0 dia	12 semanas	77, 154, 308 mg/kg/dia
1996	Grympas et al.	Ratos - Sprague-Dawley	adultos	não submetidos	8 semanas	0,20%
1996	Boivin et al.	Macacos	3 e 6 anos	não submetidos	12 semanas	100, 275, 750 mg/kg/dia
2001	Buehler	Macacos	3 e 4 anos	não submetidos	28 semanas	100, 275, 750 mg/kg/dia
2002	Delannoy	Camundongos	6 semanas	0 dia	104 semanas	200, 600, 1800 mg/kg/dia
2003	Oste et al.	Ratos - Machos	não informado	...	2, 6 e 8 semanas	200 mg/kg/dia
2003	Hott et al.	Ratos - Sprague-Dawley Machos	9 semanas	imobilização - 10 dias	1 semana e 3 dias	50, 200, 800 mg/kg/dia
2004	Ammann et al.	Ratos - Fischer	6 a 7 semanas	não submetidos	104 semanas	450, 900 mg/kg/dia
2005	Farlay et al.	Macacos	adultos	não submetidos	52 semanas	200, 500, 1250 mg/kg/dia
2007	Ammann et al.	Ratos - Fischer	6 a 7 semanas	não submetidos	104 semanas	225, 450, 900 mg/kg/dia
2008	Fuchs et al.	Ratos - Sprague - dawley	3 meses	4 semanas	12 semanas	25, 150 mg/kg/dia
2009	Ahmet-Camcioglu	Ratos - Sprague-Dawley	maduros sexualmente	3 dias	8 semanas	1800 mg/kg/dia
2009	Bain et al.	Ratos - Sprague - Dawley	6 meses	1 dia	52 semanas	125, 250, 625 mg/kg/dia
2010	Li et al.	Ratos - Sprague - Dawley	3 meses	5 meses	4 semanas	626 mg/kg/dia
2010	Habermann	não informado	12 semanas	12 semanas	4 semanas	600 mg/kg/dia
2010	Maimoun et al.	Ratos - Sprague - Dawley	6 meses	não submetidos	8 semanas	625 mg/kg/dia
2011	Boyd et al.	Ratos - Fischer	6 a 7 semanas	não submetidos	104 semanas	900 mg/kg/dia
2011	Geoffroy et al.	Camundongos	4 semanas	não submetidos	9 semanas	1800 mg/kg/dia
2011	Ma et al.	Ratos - Sprague - Dawley	6 meses	2 meses	12 semanas	150, 450 mg/kg/dia
2011	Ozturan et al.	Ratos - Sprague - Dawley	3 meses	1 mês	6 semanas	450 mg/kg/dia
2011	Yalin et al.	Ratos - Wistar	adultos	4 meses	16 semanas	500 mg/kg/dia
2012	Li et al.	Cabras	6 a 9 anos	12 meses	16 semanas	24, 40 mg/kg/dia
2012	Sheng et al.	Ratos - Sprague - Dawley	3 meses e meio	não submetidos	9 semanas	625 mg/kg/dia

1.8. Vibração Mecânica

A atividade física tem ação benéfica sobre o tecido ósseo e estudos demonstraram a importância do exercício físico na manutenção e melhora da DMO, seja na prevenção ou no tratamento da osteoporose (Vincent & Braith, 2002; Martyn & Carroll, 2006). Sua ação sobre o tecido ósseo pode ser direta ou indireta, via força mecânica ou fatores hormonais respectivamente (Oscarino & Serakides, 2005).

Existem indícios de que o exercício físico minimiza a osteopenia causada pelo avanço da idade ou por ausência dos esteroides sexuais, porém nem todos os exercícios realizados podem promover benefícios ao esqueleto de mulheres pós-menopausadas. Um estudo mostrou que exercícios aplicados com uma carga de peso moderado, como a caminhada, promove aumento do conteúdo mineral ósseo em mulheres submetidas a esse tipo de exercício (Sinaki, 1989).

Alternativas não farmacológicas foram desenvolvidas durante as últimas décadas para auxiliar no tratamento da osteoporose, tais como estimulação elétrica de baixa intensidade e plataformas vibratórias (Flieger et al., 1998; Lirani-Galvão, Lazaretti-Castro, 2010). Em vista do que há na literatura, a vibração mecânica pode ser considerada e incluída ao tratamento convencional de indivíduos que apresentam fragilidade óssea, podendo melhorar a qualidade de vida dos mesmos (Hass et al., 2006; Totossy et al., 2009).

Pesquisas recentes demonstram que o estímulo mecânico sob forma de vibração mecânica também pode ser capaz de interferir no metabolismo ósseo (Totossy et al., 2009; Oliveira et al., 2010). Segundo Veerschueren et al., 2004 e Gusi et al., 2006 a vibração mecânica tem sido indicada no tratamento e prevenção da perda de massa óssea causada pela osteoporose. Desta forma, a vibração de corpo inteiro (VCI) é uma forma de exercício físico e pode ser uma alternativa para o tratamento da osteoporose em pessoas que apresentam fragilidade para qualquer outros tipos de exercícios (Bautmans et al., 2005; Hass et al., 2006; Totossy et al., 2009), sendo cada vez mais testado quanto à sua capacidade em prevenir fraturas ósseas (Gusi et al., 2006; Totossy et al., 2009). Recentes estudos realizados com a VCI têm demonstrado o efeito positivo do estímulo no equilíbrio corporal e na capacidade motora (Bruyere et al., 2005), no entanto, o tratamento deve seguir as diretrizes de segurança específicas (Cardinale & Rittweger, 2006) para evitar lesões relacionadas ao exercício (Gusi et al., 2006; Totossy et al., 2009).

O esqueleto tem a capacidade de se adaptar as necessidades exigidas após cargas mecânicas podendo alterar sua massa, forma e microarquitetura (Martin et al., 1998; Tu et al., 2012), onde a capacidade de adaptação funcional do tecido pode ser considerada um fator importante pelo fato de promover a proliferação e diferenciação das células precursoras de osteoblastos (Ignatius et al., 2005).

A vibração mecânica (VBM) foi originalmente proposta como uma forma de reestabelecer a densidade óssea em astronautas (Rubin et al., 2001) por exercer atividade anabólica sobre o tecido ósseo (Judex et al., 2006; Rubin et al., 2006; Oliveira et al., 2010; Silva, 2011). Os efeitos da plataforma vibratória (30 Hz, 2x10 min./dia) também foram observados em mulheres caucasianas na pré-menopausa tratadas durante 12 meses, que apresentaram aumento na densidade óssea (Beck et al., 2006). Cardinale et al. (2007) verificaram uma diminuição na excreção de cálcio urinário, depois do tratamento com vibração de corpo inteiro (sessões diárias de 10 minutos), com baixa magnitude (3,5g) e frequência (30 Hz), sugerindo que este tratamento diminuiu a reabsorção óssea.

Quando a ausência de carga mecânica acontece, a perda óssea pode ocorrer e quando o osso é submetido a esse tipo de estímulo sua massa pode ser mantida ou aumentada (Tu et al., 2011). Dentre as células do tecido ósseo com potencial para detectar tensões mecânicas e traduzir estas forças em sinais bioquímicos estão os osteócitos. Devido a sua grande distribuição por toda a matriz óssea e extensa interconectividade, tem sido proposto que os osteócitos podem atuar como mecanossensores (Bonewald & Johnson, 2008; Tu et al., 2011).

Dispersos por toda a matriz mineralizada, os osteócitos comunicam-se uns com os outros e também com as células presentes na superfície óssea por meio de prolongamentos citoplasmáticos, alocados em pequenos canais denominados de canaliculos (Bonewald, 2007; Bonewald & Johnson, 2008; Bonewald, 2011). A abundância e localização estratégica faz do osteócito o candidato mais adequado para detecção de alterações nos níveis de tensão e na distribuição dos sinais que levam a respostas adaptativas do tecido (Tu et al., 2012).

Os osteócitos parecem ser capazes de relacionar a intensidade dos sinais de tensão e a distribuição da tensão ao longo de todo o osso com sinais reguladores da remodelação e formação (Bonewald & Johnson, 2008). Recentemente foi demonstrado que os osteócitos são necessários para manter a massa óssea em

resposta a um estímulo normal, porém na ausência do estímulo, os osteócitos enviam sinais para iniciar o processo de reabsorção (Tatsumi et al., 2007; Bonewald & Johnson, 2008). Estudos demonstram que cargas mecânicas podem reduzir a expressão de esclerostina, um potente inibidor de formação óssea codificada pelo gene *Sost* presente nos osteócitos, que estão localizados próximo a superfície de formação óssea (Robling et al., 2008), ativando a via Wnt, uma das primeiras a responder ao estímulo mecânico (Hens et al., 2005; Robinson et al., 2006; Tu et al., 2012). Dessa forma, as respostas do tecido ósseo aos estímulos mecânicos têm sido associadas aos osteócitos, resultando na regulação da via de sinalização Wnt (Bonewald & Johnson, 2008; Tu et al., 2012).

Há duas diferentes linhas que propagam o uso da vibração mecânica para a melhora do osso (Rittweger, 2006). Uma linha sugere que as vibrações de baixa magnitude, mas de alta frequência obtêm uma resposta osteogênica por mecanismos direto no osso. A validade deste conceito foi mostrada em um estudo com mulheres pós-menopausadas, onde a vibração aumentou a DMO de vértebras lombares (Rubin et al., 2004). A outra linha considera o papel importante que os músculos têm na manutenção do osso. Em consequência, a vibração de alta magnitude fortalece os ossos por meio de fortes contrações musculares. Em ratos, tais vibrações foram capazes de prevenir em parte a perda óssea (Flieger et al., 1998).

Os mecanismos específicos pelo qual a carga mecânica influencia o ganho de massa óssea não são totalmente conhecidos (Christiansen & Silva, 2006). Todavia, tem sido atribuído aos osteócitos o papel central na detecção desses estímulos mecânicos, que por sua vez podem ser de naturezas diversas tais como, simples tensão, pressão, campo elétrico, força de arrasto e estresse de cisalhamento (Rocheffort et al., 2010). Essas diversas formas de estímulos mecânicos irão induzir uma tensão no sistema lacuno-canalicular que será detectada pelos osteócitos através de integrinas ou proteínas associadas a integrinas e desses para o citoesqueleto, por meio de conexinas presentes nas junções comunicantes, canais iônicos ou por especializações da membrana, onde detectado o estímulo, esse irá se transformar em estímulo bioquímico (mecanotransdução) que ativará diversas vias de sinalização no citoplasma dos osteócitos (Rocheffort et al., 2010).

Canais iônicos e junções comunicantes são cogitados como meios de comunicação intercelular para transmissão bioquímica do estímulo mecânico para

osteócitos vizinhos (Scott et al., 2008), bem como para os osteoblastos nas superfícies ósseas onde serão estimulados a aumentar a produção de matriz óssea e células osteoprogenitoras a proliferarem e posteriormente se diferenciarem em osteoblastos (Oxlund et al., 2003).

1.8.1. Estudos com modelos animais

Estudos em diferentes modelos animais (tabela 2) também sugerem que o uso do estímulo mecânico de baixa intensidade e frequência podem ter efeito osteogênico culminando na melhora da qualidade e resistência óssea (Rubin et al., 2002; Verschueren et al., 2004; Judex et al., 2007; Oliveira et al., 2010).

Em 2002, Rubin e colaboradores observaram no fêmur de ovelhas que a vibração mecânica vertical (30 HZ, 0.3g, 20 min/dia, 5 dias/semana no período de 1 ano) promoveu o aumento de 34,2% na DMO, 45,6% do número de trabéculas e diminuição de 36,1% do espaço entre as trabéculas, indicando um aumento de 8,3% na quantidade de osso tanto pela formação de trabéculas novas, quanto pelo aumento da espessura das já existentes.

Flieger et al., 1998 avaliaram os efeitos da vibração mecânica de baixa intensidade e frequência (50 Hz - 2g) no tecido ósseo de ratas OVX como modelo de osteoporose na pós menopausa. Nesse estudo observou-se que densidade mineral óssea (DMO) dos animais submetidos à VBM permaneceu a mesma durante todo o experimento, enquanto que no grupo de ratas que não foram submetidas à vibração mecânica, a DMO diminuiu após 5 semanas do início do experimento e permaneceu assim até o final de 12 semanas.

Variações na frequência da vibração aplicada em ratas OVX podem influenciar na eficiência deste tratamento na formação óssea (Judex et al., 2007), outros parâmetros relacionados à vibração como a aceleração e o tempo de exposição podem ser responsáveis pelo efeito benéfico sobre o tecido ósseo (Oxlund et al., 2003; Christiansen & Silva, 2006; Rubinacci, et al., 2008).

Em um estudo recente, Oliveira et al. (2010) demonstraram que a VBM de baixa intensidade e frequência (60 Hz – 1g), minimizou os efeitos nocivos causados pela ação de glicocorticóides no tecido ósseo de ratos Wistar machos. Após 9 semanas de tratamento, os pesquisadores observaram aumento de 29,2% no número de

trabéculas ósseas em relação ao grupo glicocorticoide após análises histomorfométricas, além do aumento de 21,4% no volume ósseo das tíbias dos animais, quando comparados ao grupo controle.

Em 2009, Sehmisch et al. observaram em ratas OVX melhora significativa nas propriedades biomecânicas de vértebras lombares e aumento da densidade óssea, em animais após o tratamento com VBM (90 Hz – 5mm de amplitude) por 35 dias.

Os efeitos do tratamento com VBM a longo prazo (20 min/5 dias/semana/90Hz por 6 semanas, duas vezes ao dia) em ratas OVX foi observado por Brouwers et al. (2010), onde após o período de tratamento não foram constatadas alterações nos parâmetros ósseos estruturais das trabéculas. Já Tezval e colaboradores (2011) observaram aumento do conteúdo mineral, das propriedades biomecânicas (rigidez e carga máxima da região intertrocantérica) e de parâmetros histomorfométricos (área óssea trabecular) nos fêmures de ratos fêmea *Sprague-Dawley*, OVX submetidos ao tratamento com VBM a 90 Hz (3,9 g) durante 35 dias.

Embora pesquisas demonstrem que sinais mecânicos de baixa intensidade e frequência possuem efeito anabólico no tecido ósseo (Judex et al, 2007), pouco se sabe sobre os efeitos e mecanismos deste tipo de tratamento sobre as células e os componentes da matriz do tecido ósseo.

Tabela 2. Revisão da literatura. Trabalhos realizados com modelos animais submetidos a Vibração Mecânica

Ano	Autor	Modelo animal	Idade dos animais	Tempo de espera após ooforectomia	Período de tratamento (semanas)	Intensidade e frequência
1998	Flieger et al.	Ratos - Wistar	12 semanas	3 dias	12 semanas	2 g – 50 Hz
2001	Rubin et al.	Ratos - Sprague - Dawley	6 a 8 meses	não submetidos	4 semanas	0.25 g – 90 Hz
2002	Oxlund et al.	Ratos - Wistar	12 meses	0 dia	12 semanas	0.5, 1.5, 3.0 g – 17 Hz, 30 Hz, 45 Hz
2002	Rubin et al.	Ovelhas	6 a 8 anos	não submetidos	não informado	0.3 g – 30 Hz
2002	Rubin et al.	Ovelhas	6 a 8 anos	não submetidos	50 semanas	0.9 g – 30 Hz
2006	Christiansen, Matthew et al.	Camundongos - Machos	7 meses	não submetidos	5 semanas	0, 0.1, 0.3, 10. g – 45 Hz
2006	Judex et al.	Ratos - Sprague - Dawley	6 a 8 meses	0 dia	4 semanas	0.15 g – 45, 90 Hz
2008	Hwang et al.	Ratos - Sprague - Dawley Machos	4 meses	não submetidos	3 semanas	0.4 g – 45 Hz
2008	Rubinaci et al.	Ratos - Sprague - Dawley	3 meses	0 dia	8 semanas	0.6 g, 3 g – 30 Hz
2009	Brouwers et al.	Ratos - Wistar	6 meses	8 semanas	6 semanas	0.3 g – 90 Hz
2009	Sehmich et al.	Ratos - Sprague - Dawley	3 meses	3 meses	4 semanas	0.5 mm – 90 Hz
2010	Chow et al.	Ratos - Sprague - Dawley	6 meses	3 meses	2, 4, 6, 8 semanas	0.3 g – 35 Hz
2010	Tezval et al.	Ratos - Sprague - Dawley	3 meses	3 meses	4 semanas	3.9 g – 90 Hz
2012	van der Jagt et al.	Ratos - Wistar	5 meses	3 semanas	0, 3, 6, 10 semanas	0.5 g – 45 Hz

1.8.2. Agentes mecânicos e não mecânicos no tecido ósseo

É sabido que atividades físicas proporcionam alterações tanto na resistência quanto na massa óssea, com maior eficácia em crianças do que em adultos (Jee, Tian, 2005), além disso, quando se considera a estrutura óssea de pessoas mais velhas a atividade física tem se mostrado menos eficaz do que em indivíduos jovens (Forwood & Burr, 1993; Bassey et al., 1998). Esse decréscimo da eficácia em indivíduos mais velhos tem sido atribuído a redução da sensibilidade do tecido ósseo a estímulos mecânicos com o aumento da idade (Rubin et al., 1992; Turner et al., 1995).

Nessa perspectiva acredita-se que a resposta óssea aos estímulos mecânicos de indivíduos mais velhos, pode ser potencializada quando combinada com agentes não mecânicos (Forwood et al., 2001), para melhorar a sensibilidade e de forma sinérgica aumentar a massa e a força óssea (Jee & Tian, 2005). Dentre os agentes não mecânicos utilizados estão o PTH (Mikuni-Takagaki, 1999; Jee & Tian,

2005), o estrógeno (Rutherford, 1999; Jee & Tian, 2005), a prostaglandina E2 (Tang et al., 1997) e o hormônio de crescimento (Jee & Tian, 2005).

Em 1965, Johnson sugeriu pela primeira vez os efeitos benéficos da associação entre a carga mecânica e agentes anabólicos em um estudo realizado em homens submetidos ao tratamento com fluoreto de sódio (NaF), onde foi observado que a resposta anabólica foi mais rápida nos locais do tecido que foram submetidos a carga mecânica.

Silva et al. (2011) investigaram por um período de 90 dias os efeitos das isoflavonas e da vibração mecânica como tratamentos aplicados de forma isolada e combinada no tecido ósseo de ratas ooforectomizadas. Foi constatado o aumento da densidade óssea e o efeito positivo na espessura do osso cortical, mostrando que o tratamento com isoflavonas e vibração mecânica de forma individual ou combinada teve efeito positivo no tecido ósseo de ratas osteopênicas.

Apesar de existirem evidências positivas sobre a associação de agentes anabólicos com a carga mecânica no aumento da massa óssea em estudos pré-clínicos, ainda são necessários mais estudos que busquem elucidar a eficácia de tais tratamentos e seus mecanismos de ação no tecido ósseo (Jee & Tian, 2005).

Considerando-se o interesse por um melhor entendimento sobre os efeitos do SrR e da VBM nos constituintes do tecido ósseo e frente à escassez de relatos desses tratamentos associados sobre as células e a matriz óssea, o objetivo desse estudo foi verificar o tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência no tecido ósseo de ratas osteopênicas tratadas por 3 meses.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- ✓ Caracterizar as alterações do tecido ósseo de ratas osteopênicas submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência.

2.2. Objetivos Específicos:

- ✓ Comparar a espessura e comprimento dos fêmures e tíbias dos grupos estudados;
- ✓ Analisar a densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo e a área óssea tanto da região de corpo total como da região fêmur - tíbia;
- ✓ Analisar as propriedades físicas e biomecânicas em tíbias e vértebras;
- ✓ Quantificar o volume ósseo e espessura do osso cortical no fêmur;
- ✓ Avaliar as fibras colágenas no osso trabecular e cortical do fêmur distal;
- ✓ Identificar e quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados e o ácido hialurônico por parâmetros de biologia molecular;
- ✓ Avaliar a presença de osteoclastos no osso fêmur distal.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (Projeto n. 1095/11) e segue os princípios do “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication n. 85-23, revised 1996) e está de acordo com a lei 11.794 de 08 de outubro de 2008.

3.1. Animais de experimentação

Foram utilizadas 40 ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), adultas, inicialmente com 6 meses de idade, virgens, pesando aproximadamente 240 gramas, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

Os animais foram transportados para o biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética, onde permaneceram confinados em gaiolas (5 animais por gaiola) de 45x30x15 cm de comprimento, largura e altura respectivamente. Os mesmos foram mantidos com alimentação (Nuvilab CR1, Paraná, Brasil; composição por quilograma do produto: cálcio de 1,0% a 1,2%, fósforo de 0,78% a 0,90%, zinco aproximadamente 60mg, vitamina D3 1.800,00 UI) e água *ad libitum* à temperatura ambiente de 22°C e com iluminação artificial, sendo o ciclo claro-escuro constante e o período de luz das 7 às 19 horas.

3.2. Obtenção dos animais com osteopenia

3.2.1 Ooforectomia bilateral

Ao completarem 6 meses de idade os animais foram submetidos à OVX bilateral com o objetivo de interromper a atividade dos estrogênios ovarianos induzindo-os a um quadro de osteopenia. A OVX foi realizada sob anestesia intraperitoneal com Cloridrato de Cetamina a 10% (0,3mL) e Xilazina a 2% (0,1mL), respectivamente, anestésico e relaxante muscular. Posteriormente, foi realizada a tricotomia na região abdominal em área de 4x2 cm², acima da vagina, em seguida, no local foi aplicado álcool iodado com auxílio de gazes para obter melhor condição de anti-sepsia. Em

seguida, a pele foi incisada com bisturi, com aproximadamente 1,5 cm de extensão, e o tecido muscular foi afastado do tecido cutâneo com auxílio de uma tesoura do tipo romba e uma pinça dente de rato. A musculatura foi incisada até atingir a cavidade peritoneal, onde foi localizado o útero bifurcado e os ovários, em cada ovário foi realizado uma ligadura com fio de algodão (Catgut, USP 4-0, EP 1,5, Brasuture, Brasil) aproximadamente 1 cm abaixo do ovário sendo o mesmo seccionado. Após a retirada dos ovários e parte do corno uterino, os demais tecidos foram internalizados e foi realizada a sutura da musculatura e da pele com fio de sutura reabsorvível (Catgut gastrointestinal com agulha 3/8, USP 4-0, EP 2, Brasuture, Brasil) (figura 4). A língua do animal foi pinçada e distendida para fora da cavidade bucal para evitar asfixia. O modelo experimental para osteopenia foi baseado no trabalho desenvolvido por Giardino et al. (1993), padronizado e adaptado por nosso grupo, sendo utilizado com frequência e bem sucedido em nossos trabalhos experimentais.

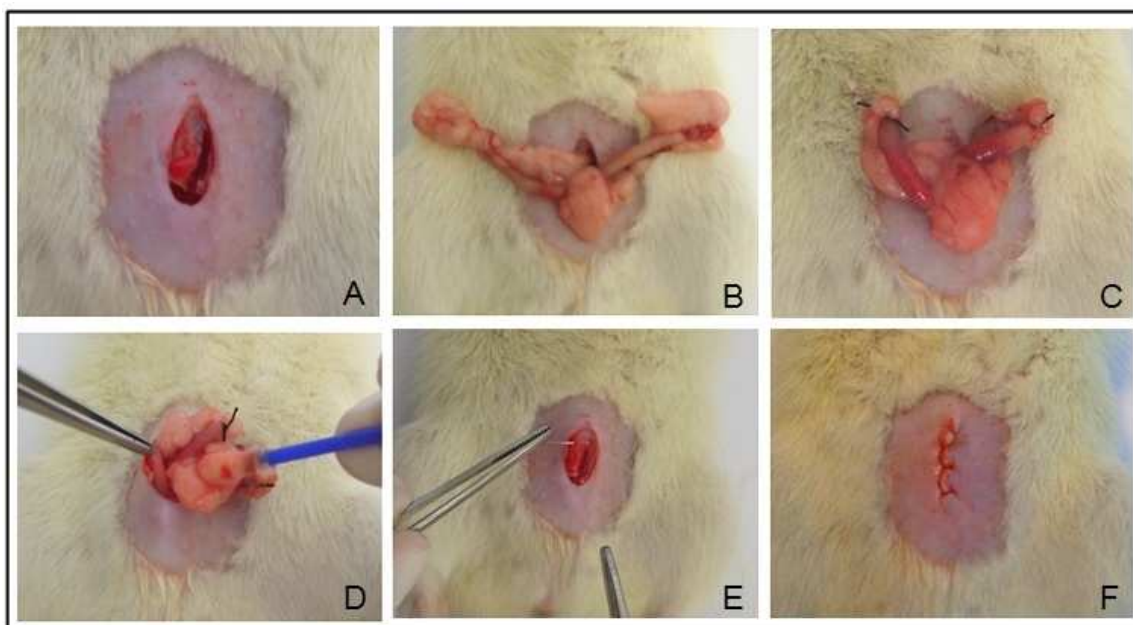


Figura 4. Fotos ilustrando o procedimento cirúrgico da ooforectomia bilateral. A) Incisão na pele e no músculo; B) Exposição dos ovários; C) Ligadura das tubas uterinas com fio de algodão e retirada dos ovários; D) Reinternalização das tubas uterinas e tecidos adjacentes E) Sutura da musculatura; F) Sutura da pele. (Cedido por Pacheco-Costa, 2010).

3.2.2. Pós-operatório

Ao término do procedimento cirúrgico 15 gotas de Ibuprofeno (50mg/ml) foram diluídos em 500 ml de água e disponibilizados no bebedouro durante 2 dias para promover analgesia. Este protocolo foi adaptado de Derry et al. (2009). A fim de promover uma rápida cicatrização abdominal foi realizado diariamente por 7 dias consecutivos a antissepsia com iodopovidona a 10% sobre a pele suturada do animal.

3.2.3. Procedimento para exames colpocitológicos

Todos os animais foram submetidos a exames colpocitológicos por quatro dias consecutivos, no mesmo horário, a partir do 24º dia após a ooforectomia para a confirmação da interrupção do hormônio estrogênio.

O exame foi feito com uma haste de algodão previamente imersa em NaCl 0,9% e inserida na vagina de cada rata, mas não profundamente, e realizado movimentos circulares no interior. Em seguida o material coletado foi distendido sobre uma lâmina de vidro e fixado em uma solução de álcool - éter (1:1) por 20 minutos, corado pelo método de Shorr-Hematoxilina (Shorr, 1941) e analisados ao microscópio de luz. Apenas os animais que se apresentaram em anestro (sem produção de estrogênio e progesterona) durante os quatro dias analisados foram utilizados experimentalmente.

3.2.4. Tratamento dos animais

Os animais foram pesados semanalmente de forma individual em uma balança digital após a ooforectomia e 90 dias depois foram distribuídos em 4 grupos sendo GI Controle, GII tratado com SrR (5-[bis(carboxy-methyl)amino]-2-carboxy-4-cyano-3-thiophenacetic acid, distrontium salt; S12911-PROTOS®, Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France), GIII tratado somente com vibração mecânica e GIV tratado com SrR+VBM. A divisão dos grupos está listada a baixo:

Grupo I (Controle) – 10 ratas gavadas com solução-veículo (água), 7 dias por semana durante 90 dias.

Grupo II - SrR – 10 ratas gavadas com 625 mg/kg/dia de SrR, 7 dias por semana durante 90 dias.

Grupo III - VBM – 10 ratas submetidas à VBM por 20 min. à 60Hz/0.6g/dia, 5 dias por semana durante 90 dias.

Grupo IV - SrR+VBM – 10 ratas gavadas com 625 mg/kg/dia de SrR, 7 dias por semana + VBM por 20 min. à 60Hz/0.6g/dia, 5 dias por semana durante 90 dias.

A gavagem e a vibração mecânica em todos os grupos foram administradas sempre no mesmo período (figura 5).

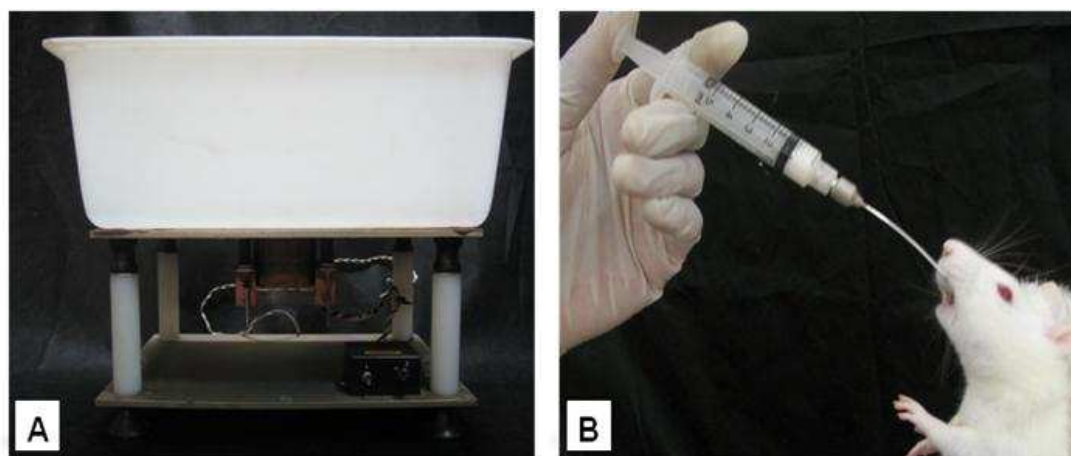


Figura 5. A) Foto mostrando a gaiola vibratória. B) Foto do procedimento de gavagem.

3.3. Procedimento de vibração mecânica

Para o procedimento de VBM foi utilizado uma plataforma vibratória de 50 cm x 30 cm e 20 cm de altura, cedida gentilmente pela Dra. Marise Lazaretti Castro da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP, desenvolvida pelo Prof. Dr Orivaldo Lopes da Silva do departamento de Bioengenharia da USP- São Carlos. Os animais dos grupos GIII (VBM) e GIV (SrR+VBM) foram alocados sobre gaiola vibratória (5 animais por vez) e submetidos a vibração mecânica de baixa intensidade (60Hz; 0,6g), 20min/dia, 5 vezes por semana, durante 90 dias. Todos os animais do grupo GIV receberam por gavagem o SrR após o tratamento com a vibração mecânica.

Foi utilizada uma tampa adequadamente confeccionada e colocada sobre a plataforma a uma distância de 4 cm dos animais, para que os mesmos pudessem permanecer em sua postura habitual, com os membros apoiados na plataforma, o mais confortável possível para serem submetidos de maneira adequada a vibração mecânica no corpo inteiro.

3.4. Avaliação do grau de Osteoporose por Densitometria Óssea

Todos os animais foram submetidos à Densitometria óssea (absometria de energia e raios X – DEXA - modelo Hologic Discovery A- S/N 45274) antes e depois do tratamento, a fim de analisar o conteúdo mineral ósseo (CMO), a densidade mineral óssea (DMO) e área óssea (Área) da região do corpo total e também da região do fêmur - tíbia. Para a realização do exame os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina a 10% e Xilazina a 2% por via intraperitoneal, na proporção de 2/1 respectivamente. Após, foram posicionados em decúbito ventral e os membros permaneceram estendidos, em seguida foi feito o exame que teve duração de 1min para cada animal (figura 6). Este exame foi realizado em conjunto com a disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina da UNIFESP.

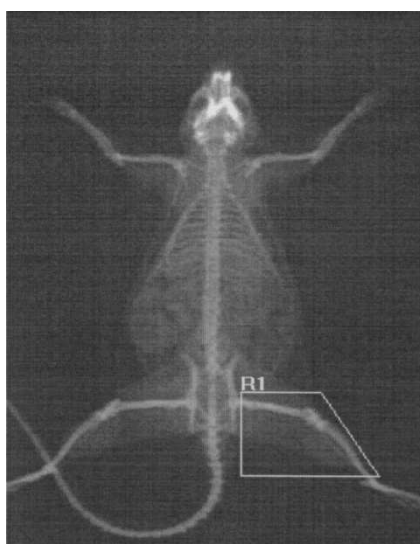


Figura 6. Densitometria óssea de rata *Wistar* com 9 meses de idade, onde a região R1 representa a tíbia e fêmur que foram analisados.

3.5. Animais submetidos à eutanásia para retirada dos fêmures, tíbias e vértebras

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 90 dias após o início do tratamento (24 horas após a administração da última dose de ranelato de estrôncio ou solução-veículo e vibração mecânica) (figura 7). Os animais foram eutanasiados após a densitometria óssea final com dose excessiva de Cloridrato de Cetamina a 10% (0,7mL) e Xilazina a 2% (0,3mL) por via intraperitoneal. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e com um bisturi foi efetuada uma incisão linear de extensão entre a região anterior da tíbia até o final de cada fêmur. Em seguida os fêmures e tíbias foram dissecados e imediatamente mensurados. Após a retirada do fêmur e da tíbia foi realizado a dissecação das vértebras e para isso, a coluna vertebral foi localizada, e em seguida foi realizado um corte longitudinal com auxílio do bisturi expondo as vértebras, a partir disso a quinta vértebra lombar (L5) foi identificada e isolada tendo como referência a articulação da primeira vértebra sacral (S1).

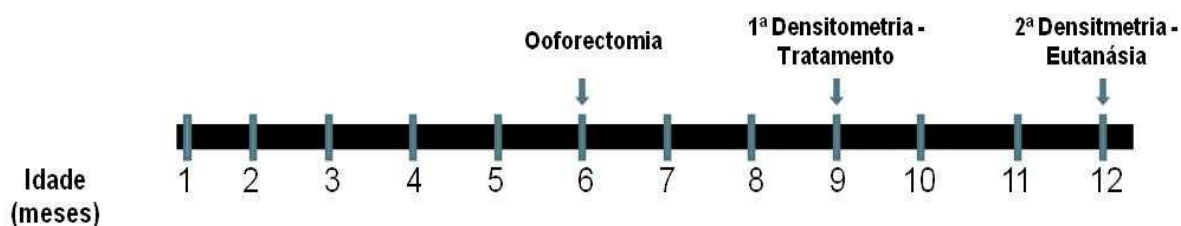


Figura 7. Linha do tempo do modelo animal. Esquema dos respectivos meses em que foi realizado plano experimental com o modelo animal.

3.5.1. Mensuração do comprimento e espessura dos fêmures e tíbias

Nos fêmures o comprimento foi obtido do trocânter maior até o côndilo lateral e nas tíbias o comprimento total foi obtido da extremidade de cada epífise. Em ambos, a espessura foi obtida no centro da diáfise. Todas as medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital (Lee Tolls, erro de precisão de 0,01mm) (figura 8). Após, as tíbias foram direcionadas para a análise das propriedades físicas e biomecânicas e os fêmures foram seccionados e direcionados para análises Histológicas, Histomorfométricas, Histoquímicas e Biomoleculares.



Figura 8. Fêmur de rata *Wistar*. Mostrando o local da secção dos fêmures (tracejado) para obtenção do fêmur distal (B).

3.6. Análise das propriedades físicas e biomecânicas em tíbias e vértebras

Para a realização desses ensaios foram dissecadas as tíbias direitas de todos os animais e para as vértebras foi utilizada a quinta vértebra lombar (L5) de sete animais. Ambas foram limpas e congeladas em NaCl 0,9% a -20°C imediatamente após o sacrifício. As análises foram realizadas em conjunto com o Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

3.6.1. Propriedades físicas das tíbias e vértebras

As tíbias e as vértebras foram descongeladas e limpas novamente para a remoção de qualquer tecido residual, sendo das vértebras retiradas também os processos transversos, espinhosos e arcos vertebrais, permanecendo somente o corpo da vértebra. Após, as extremidades do corpo foram aplainadas a fim de se obter superfícies planas e paralelas. Todos os ossos foram imersos separadamente em água destilada e mantidas em um dissecador (DI-PUMP) por 24 horas para retirada do ar dos poros ósseos. O volume ósseo (VO) e a densidade óssea (DO) foram calculados segundo o princípio de Arquimedes, para tal, o peso imerso (P_i) foi calculado inserindo os ossos (tíbias e vértebras) um de cada vez em um béquer com água destilada à temperatura ambiente, suspensas individualmente por um fio de cobre e sob uma

balança de precisão. Em seguida esses ossos foram pesados para obtenção do peso úmido (Pu) (Hughes, 2005).

O peso seco (Ps) foi obtido após a desidratação em estufa a 100°C por 24 horas. Os ossos foram então colocados na mufla a 800°C (Quimis, modelo Q318A) por 24 horas para obtenção do peso das cinzas (Pc) (Bedani et al., 2006). Todas as medidas foram realizadas em balança analítica de precisão (Chyo JK-180, Japan, erro de precisão de 0,0001g). Os seguintes parâmetros foram avaliados: densidade óssea (g/cm³), volume ósseo (cm³), densidade mineral óssea (g/cm³), porcentagem de água, de material orgânico e de material mineral no osso. Os valores obtidos das pesagens foram calculados com base nas fórmulas abaixo descritas (Martin, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual ósseo de água} = 100 \times \frac{(P_u - P_s)}{P_u} (\%)$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{V_o} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual de material orgânico} = 100 \times \frac{(P_s - P_c)}{P_u} (\%)$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_c}{V_o} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual de material mineral} = 100 \times \frac{(P_c)}{P_u} (\%)$$

Onde:

Pu = peso do osso úmido

Pc Pc = peso das cinzas (material mineral)

Pi = peso do osso imerso

Vo = Volume ósseo

Ps = peso do osso seco

ρ = densidade da água (= 1)

3.6.2. Propriedades biomecânicas das tíbias e vértebras

As análises das propriedades biomecânicas foram realizadas em uma máquina de ensaio universal Instron (Instron Cop. modelo 4444, EUA).

Para a realização das análises nas tíbias foi utilizado o teste de flexão a três pontos, onde as mesmas foram posicionadas horizontalmente em dois roletes com diâmetro de 3 mm (distanciados em 21,7mm) onde foi aplicado uma força perpendicular ao eixo longitudinal do osso por uma haste cilíndrica contendo um rolete (de 3 mm) em sua extremidade, com capacidade de 1 kN de carga. Foi aplicada uma

pré-carga de 5N para estabilizar a tíbia, e depois se manteve uma velocidade de 5 mm/min. até o momento da fratura. Com base no teste foram obtidos: carga máxima (N), carga de fratura (N), resiliência (J), tenacidade (J) e rigidez (N/mm) (figura 9).

Para a análise nas vértebras foi realizado o ensaio de compressão no qual foi utilizado uma carga de 1 kN, aplicando-se uma pré carga de 10 N para estabilizar e fixar o corpo da vértebra. A velocidade de aplicação da carga foi de 2 mm/min. no sentido do eixo crânio-caudal até o esmagamento parcial da vértebra (2/3 da altura da vértebra). Ao final foram obtidos: carga de fratura (N), resiliência (J), tenacidade (J) e rigidez (N/mm) (figura 10).

Os ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX Automated Materials Tester - version 8.09.00. Todos os testes foram realizados por um investigador cego para os grupos estudados.

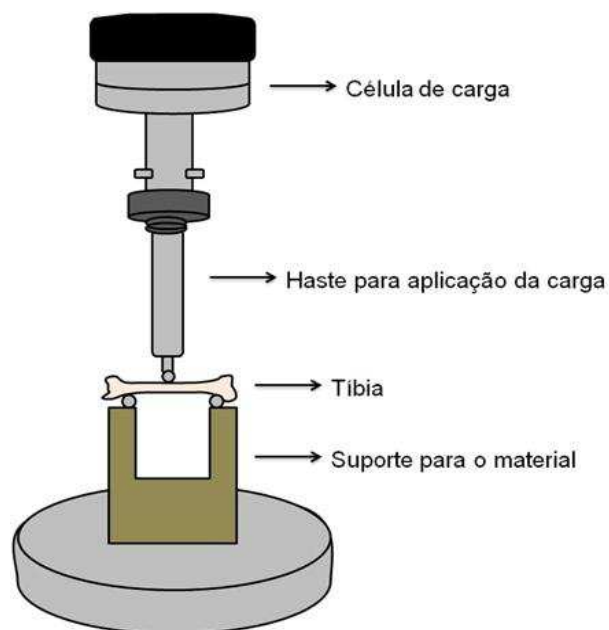


Figura 9. Ilustração do ensaio biomecânico de flexão a três pontos realizados em tíbia. (Cedido gentilmente por Campos, 2013).

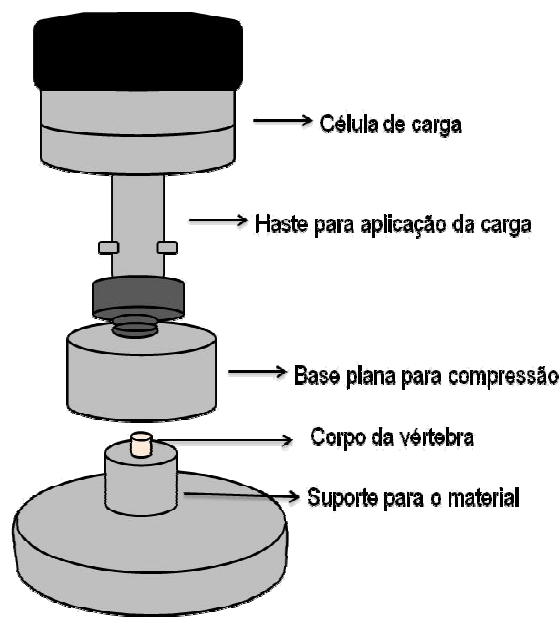


Figura 10. Ilustração do ensaio biomecânico de compressão em vértebras. (Cedido gentilmente por Campos, 2013).

3.7. Análises Histológicas: Histomorfométrica e Histoquímica

Os fêmures distais direito e esquerdo foram fixados em formaldeído 4% (preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) por 4 dias e descalcificados em EDTA a temperatura ambiente por aproximadamente 90 dias. A descalcificação foi confirmada introduzindo levemente um alfinete no osso, até que o mesmo não apresentasse resistência. Posteriormente, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 1 hora e 30 min. cada e três trocas de álcool 100% a cada 2 horas, sendo a última troca overnight, após foram diafanizados em xilol, com duas trocas de 2 horas cada e uma de 4 horas, em seguida foi feita uma mistura com xilol e parafina (1:1) e as amostras foram deixadas overnight em estufa a 60°C. No dia seguinte as amostras foram impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 60°C por 48 horas e incluídas. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica, Modelo RM 2145), em cortes semi sequenciados, ajustado para 5µm. Os cortes foram distendidos em banho-maria e coletados em lâminas histológicas. Após secagem por 2 - 4 horas em estufa a 60°C as lâminas foram destinadas aos métodos abaixo descritos.

3.7.1. Histomorfometria

Para verificar a preservação do tecido e realizar a histomorfometria foi utilizada a Hematoxilina, que evidencia o núcleo em azul ou violeta e a Eosina, que evidencia o citoplasma e o colágeno em magenta (Junqueira, Carneiro, 2008). Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol, lavados em água destilada e evidenciados pela hematoxilina por 5 min. Após uma nova lavagem em água destilada, os cortes foram evidenciados pela eosina por 1 minuto. Em seguida, foram desidratados, diafanizados em xilol e montados com Entellan®. As fotomicrografias foram obtidas com auxílio de um microscópio de luz (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss, Germany) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss, Germany). As análises histomorfométricas foram realizadas com auxílio de um software semiautomático (AxioVision Rel. 4.6., Carl Zeiss, Germany).

Para a padronização da histomorfometria da área óssea trabecular, as análises foram feitas 390 μm abaixo do ponto inferior do disco epifisário, no qual foi delimitado um quadrante de 1800 X 1600 μm que foi ajustado em 390 μm a partir da região externa do osso cortical. Dentro desse quadrante foi realizada a delimitação de cada trabécula (semi-automaticamente), gerando uma área em μm^2 para cada trabécula que somadas contabilizaram a área total. Para a espessura do osso cortical foi estabelecido uma média dos 3 pontos da espessura (superior, meio e inferior) já estabelecidos pelo quadrante delimitado para a área óssea trabecular (figura 11).

Foram utilizados cinco cortes sequenciados de cada animal para a quantificação da área óssea trabecular (BV/TV) e espessura do osso cortical (Ct.Wi) que foram feitas semi-automaticamente no programa AxionVision REL 4.6 (Carl Zeiss). As abreviações da histomorfometria estão de acordo com a nomenclatura adotada pelo comitê da ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) (Parfitt et al., 1987).

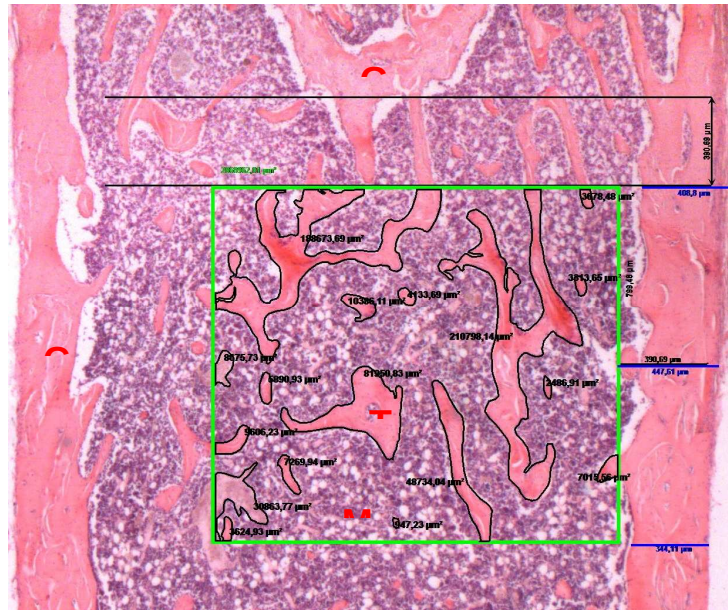


Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico do osso fêmur distal de rata *Wistar* corado por hematoxilina e eosina (H.E). Visão geral da região delimitada para a análise do volume ósseo (quadrado / linha verde) e dos 3 pontos analisados para obtenção da espessura do osso cortical (linhas azuis). Ct: osso cortical; Gp: disco epifisário; Ma: medula óssea; Tb: trabécula.

3.7.2. Histoquímica

- **Picro-Sirius Red (PS) – polarização**

O corante Sirius Red evidencia as fibras colágenas em vermelho-alaranjado (Kiernan, 2008). Quando examinado em luz polarizada as fibras colágenas mais espessas se apresentam nos tons avermelhados e as mais finas aparecem nos tons esverdeados (Hirshberg et al., 2007; Retamoso et al., 2009).

Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol e incubados com o ácido fosfomolibdico a 0,2% por 10 minutos para neutralizar a birrefringência da elastina. Depois, os cortes foram lavados em água destilada e imersos por 90 minutos em solução de sirius red a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Posteriormente, os cortes foram lavados em HCl 0,01 N durante 2 minutos. Depois as lâminas foram desidratadas em gradiente crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan®. As análises foram realizadas semi-quantitativamente com o auxílio de um microscópio de luz polarizada (Axioskop

40, Carl Zeiss, Germany) em todos os animais de todos os grupos, utilizando-se cinco cortes por animal.

3.7.3. Técnica do TRAP

Para identificar os osteoclastos foi utilizado o método do TRAP ("Tartrate Resistant Acid Phosphatase") um marcador de osteoclastos (Minkin, 1982). Este método é baseado na detecção da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato, presente em osteoclastos. A solução de incubação foi preparada dissolvendo 8 mg de naftol AS-BI (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em 500 µl de N-N-dimetilformamida, seguindo-se a adição de 50 ml de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0, acrescido de 70 mg de "Fast Red Salt TR" (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Foi adicionado, posteriormente, tartarato de sódio 50 mM à solução que foi então filtrada. Após a incubação a 37 °C, os cortes foram lavados em água destilada, contracolorados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio aquoso. Como controle de especificidade, alguns cortes foram incubados na ausência do substrato (naftol AS-BI).

3.8. Análises Biomoleculares

3.8.1. Extração, identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos no fêmur

Fragmentos de fêmures (n=7-9) livres de cartilagem foram imersos em PBS com inibidor de protease por 3 horas, após foram descalcificados com ácido fórmico a 25% (pH 2,0) por 2 dias e armazenados em PBS com inibidor de protease a 4°C até o início do processamento das amostras. Estas análises foram realizadas em conjunto com a Disciplina de Biologia Molecular - UNIFESP. Cada fragmento foi individualmente pesado e macerado com auxílio de nitrogênio líquido. Após, para a liberação dos GAGs o material foi digerido com papaína (Calbiochem, USA) em tampão cisteína-fosfato (pH 6,5) por 18 horas a 60°C. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi coletado e adicionado TCA a 90% (ácido tricloroacético) no volume final de 10% em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente foram centrifugados por 30 min em temperatura ambiente e ao sobrenadante foram adicionados dois volumes de metanol gelado sob constante agitação e, mantidos a -20°C por 24h para precipitar os glicosaminoglicanos sulfatados.

O material foi então centrifugado por 30 min a 4000 rpm a 4°C, e o sobrenadante foi descartado e o material foi seco a temperatura ambiente. O Pellet foi ressuspendido em 30µL de água destilada e 5µL foi aplicado em gel de agarose a 0,55% em tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato, 0,05M, pH 9,0). Após os GAGs foram precipitados na agarose com uso do detergente catiônico CETAVLON (brometo de cetiltrimetilamônia) a 0,1% por 2 horas e depois o gel foi seco sob calor e ventilação, sendo corado posteriormente com azul de toluidina (0,1%) em ácido acético (0,1%) e etanol (50%) por 15 minutos. O excesso de corante foi removido com solução descorante de ácido acético (0,1%) em etanol (50%). Em seguida, o gel foi seco em temperatura ambiente.

A identificação dos GAGs sulfatados foi realizada comparando-se a migração das amostras com uma solução de GAGs conhecidos e purificados (CS, DS e HS, na concentração de 1mg/mL cada). De acordo com a mobilidade eletroforética, a banda de maior migração é uma mistura de condroitim- 4 (extraído de cartilagem de baleia) e 6 - sulfato (extraído de cartilagem de tubarão), a intermediária de dermatam sulfato (extraído de pele de porco) e a terceira de heparam sulfato (extraído de pâncreas bovino). A quantificação foi realizada através da densitometria a 525nm. Os valores foram expressos em µg/mg de tecido.

3.8.2. Quantificação do ácido hialurônico pelo ELISA

Após a proteólise do tecido, o glicosaminoglicano ácido hialurônico foi quantificado com auxílio do método do ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) padronizado por Martins et al. (2003). Esta análise foi realizada em conjunto com a Disciplina de Biologia Molecular - UNIFESP. Em uma placa do ELISA revestida com sonda de AH foram adicionados 100µL/poço das soluções padrão de ácido hialurônico de cordão umbilical em concentrações diferentes (0 a 500µg/mL) diluídas no tampão de ensaio (Tris-HCl 0,05M pH 7,75 e 1% BSA). Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

Após incubação da placa por 18 horas a 4%, a mesma foi lavada 3 vezes em tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,75). Em seguida foram adicionados 100µL da sonda de AH biotinilada (1mg/mL) diluída 1:10000 em tampão de ensaio em cada poço, sobre agitação durante 90 min a 25°C. Em seguida, a placa foi lavada 6

vezes com tampão de lavagem e adicionado 100µL/poço de estreptavidina marcada com európio (diluído 1:10000 em tampão de ensaio). A incubação ocorreu por 30 min a 25°C seguida por 6 lavagens para remover a estreptavidina não conjugada.

Para liberar o európio ligado a estreptavidina, foi adicionado 200µL de “enhancement” por poço e agitou-se por 10 minutos. O európio livre na placa foi lido em fluorímetro. Os valores foram expressos em µg/g de tecido.

3.9. Análise estatística

Os dados numéricos foram expressos em Média ± Desvio Padrão (DP) para as tabelas e também em Mediana, Mínimo e Máximo para os gráficos Box plot. Os grupos foram comparados com o teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Turkey, para observar se ocorreram diferenças entre os grupos. Quando comparamos o mesmo grupo antes e depois utilizamos o teste Wilcoxon, que é um método não paramétrico para comparação de duas amostras pareadas. O nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). Para todos os testes foi utilizado o programa GraphPad Prism (version 5.00).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Massa corporal

Todos os animais foram pesados semanalmente durante o experimento, e foi observado que todos os grupos apresentaram ganho de massa corporal após a ooforectomia. Durante o período de tratamento a massa corporal dos grupos permaneceu estável e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao final do tratamento (figura 12).

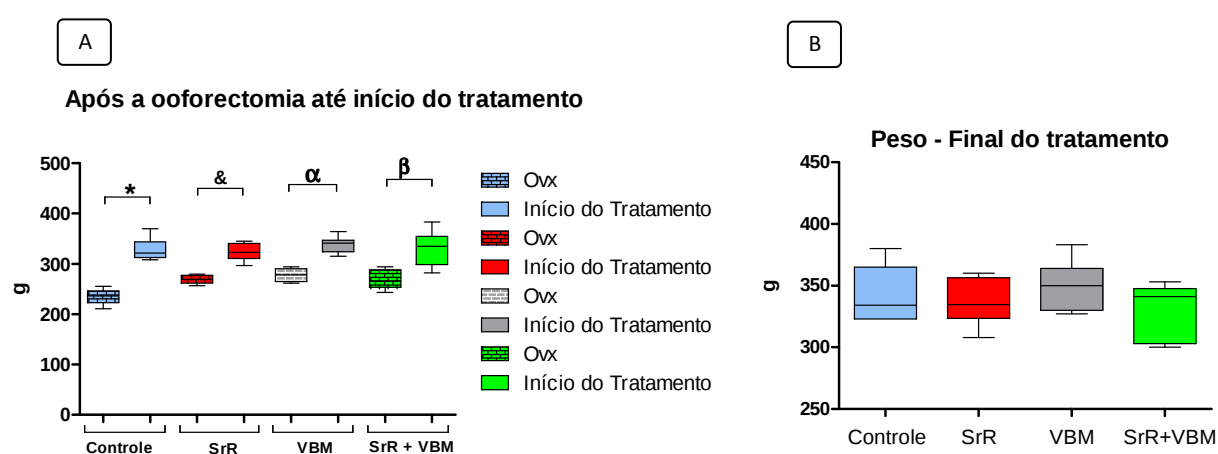


Figura 12. Gráficos de massa corporal. **A.** Massa corporal do dia da ooforectomia (OVX) até o início do tratamento de cada grupo. **B.** Massa corporal ao término do tratamento. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. * vs Controle. & vs SrR. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

4.2. Análises biométricas dos fêmures e tíbias

As análises biométricas realizadas nos fêmures revelaram que o grupo tratado com SrR apresentou espessura maior que os outros grupos, contudo diferenças no comprimento não foram observadas. Nas tíbias os grupos VBM e SrR+VBM apresentaram tanto o comprimento quanto a espessura maiores quando comparados ao grupo Controle, e o grupo VBM foi o único que apresentou comprimento superior ao grupo SrR (figura 13 e tabela 3).

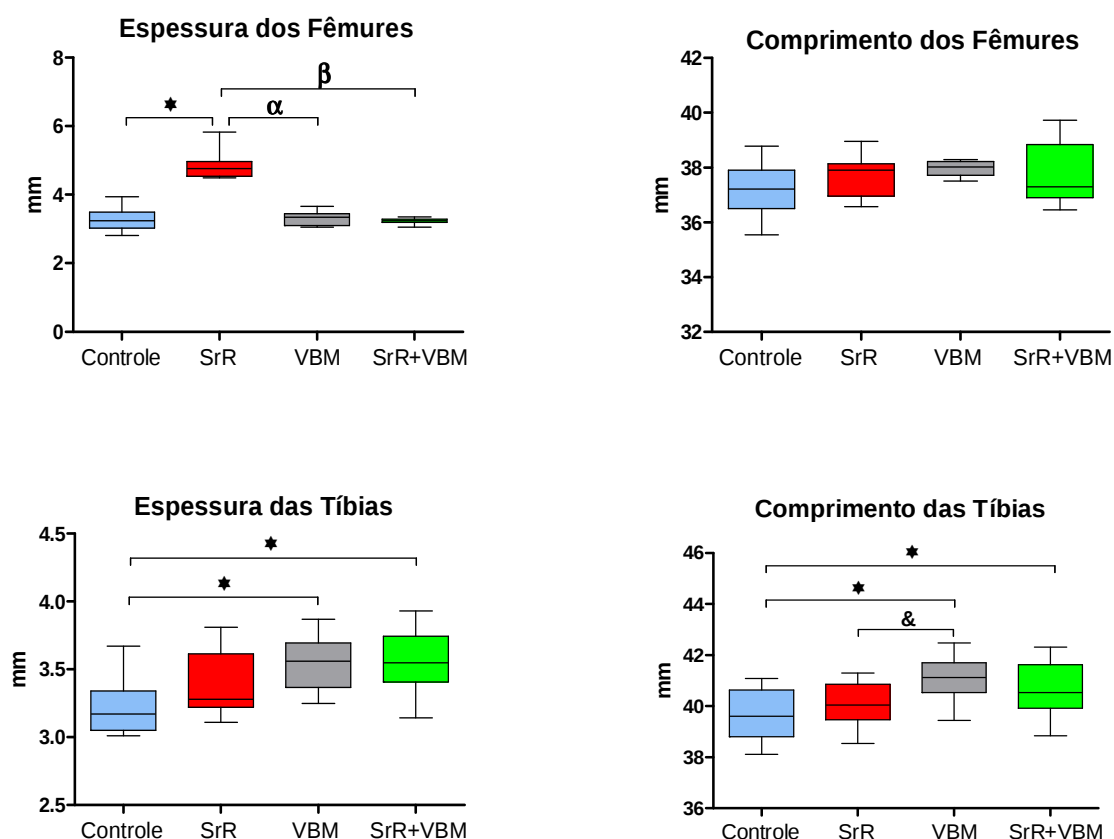


Figura 13. Gráficos de espessura e comprimento dos fêmures e tíbias. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. * vs Controle. & vs SrR. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

Tabela 3. Análises biométricas dos fêmures e tíbias

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
Espeçura do Fêmur	3,30 $\pm$ 0,31	4,85 $\pm$ 0,36 * $\alpha\beta$	3,30 $\pm$ 0,19	3,23 $\pm$ 0,11
Comprimento do Fêmur	37,20 $\pm$ 0,81	37,70 $\pm$ 0,70	37,30 $\pm$ 1,59	37,86 $\pm$ 1,07
Espeçura da Tíbia	3,26 $\pm$ 0,39	3,42 $\pm$ 0,25	3,46 $\pm$ 0,46 *	3,53 $\pm$ 0,25 *
Comprimento da Tíbia	39,65 $\pm$ 0,96	40,05 $\pm$ 0,80	41,08 $\pm$ 0,83 * $\&$	40,67 $\pm$ 1,00 *

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * vs Controle. & vs SrR. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

4.3. Densitometria óssea

Os animais foram submetidos à densitometria óssea antes e ao final do tratamento. Dessa forma, foi possível comparar cada grupo individualmente antes e

depois do tratamento, bem como todos os grupos no final. Além disso, foram analisadas as regiões de corpo total e do fêmur-tíbia (região R1).

Ao comparar cada grupo individualmente antes e depois do tratamento, verificou-se que o grupo SrR foi o único a obter ganho em todos os parâmetros analisados (DMO, CMO e Área), tanto na região de corpo total quanto na região do fêmur-tíbia (tabela 4 e 5). Já o grupo submetido ao tratamento com VBM apresentou perda na DMO na região do fêmur-tíbia (tabela 5), além disso, foi observado que a DMO do grupo que recebeu a terapia combinada foi preservada após o tratamento, tanto na região do fêmur-tíbia e do corpo total (tabela 4 e 5), e o grupo Controle apresentou aumento da área na região de corpo total (tabela 4).

Tabela 4. Densitometria óssea antes e depois do tratamento - região de corpo total

Grupos		DMO (g/cm ²)	CMO (g)	Área (cm ²)
Controle	Antes	0,15 ± 0,01	10,21 ± 0,90	64,34 ± 4,30
	Depois	0,15 ± 0,01	11,11 ± 1,01	72,85 ± 5,99 [#]
SrR	Antes	0,16 ± 0,00	11,05 ± 0,81	70,21 ± 3,50
	Depois	0,18 ± 0,01 ^{\$}	12,88 ± 0,89 ^{\$}	73,50 ± 4,35 ^{\$}
VBM	Antes	0,15 ± 0,01	11,40 ± 0,72	73,60 ± 3,66
	Depois	0,16 ± 0,01	11,38 ± 0,52	72,99 ± 2,39
SrR+VBM	Antes	0,15 ± 0,01	10,92 ± 1,16	71,39 ± 5,50
	Depois	0,16 ± 0,01	11,70 ± 1,36	72,48 ± 5,54

Dados expressos em média ± desvio padrão. [#] Controle antes do tratamento vs Controle depois do tratamento. ^{\$} SrR antes do tratamento vs SrR depois do tratamento

Tabela 5. Densitometria óssea antes e depois do tratamento - região do fêmur-tíbia

Grupos		DMO (g/cm ²)	CMO (g)	Área (cm ²)
Controle	Antes	0,13 ± 0,01	0,68 ± 0,06	5,19 ± 0,24
	Depois	0,14 ± 0,01	0,71 ± 0,05	5,12 ± 0,26
SrR	Antes	0,14 ± 0,01	0,76 ± 0,06	5,36 ± 0,30
	Depois	0,15 ± 0,01 ^{\$}	0,87 ± 0,04 ^{\$}	5,60 ± 0,21 ^{\$}
VBM	Antes	0,14 ± 0,01	0,75 ± 0,05	5,31 ± 0,17
	Depois	0,13 ± 0,01 [@]	0,74 ± 0,03	5,48 ± 0,20
SrR+VBM	Antes	0,14 ± 0,01	0,76 ± 0,06	5,36 ± 0,30
	Depois	0,14 ± 0,01	0,75 ± 0,06	5,32 ± 0,31

Dados expressos em média ± desvio padrão. ^{\$} SrR antes do tratamento vs SrR depois do tratamento. [@] VBM antes do tratamento vs VBM depois do tratamento.

Quando comparamos todos os grupos ao final do tratamento foi observado que o grupo SrR apresentou maior DMO comparado aos outros grupos, tanto na região de corpo total como na região do fêmur-tíbia estatisticamente significativa. O CMO do grupo SrR no corpo total foi superior ao do grupo Controle e VBM, já na região do fêmur – tíbia o CMO do SrR foi superior a todos os outros. Em relação à área óssea não foram observadas diferenças significantes entre os grupos na região de corpo total, porém na região fêmur – tíbia os grupos SrR e VBM apresentaram maior área comparados ao Controle (figura 14 e tabela 6 e 7).

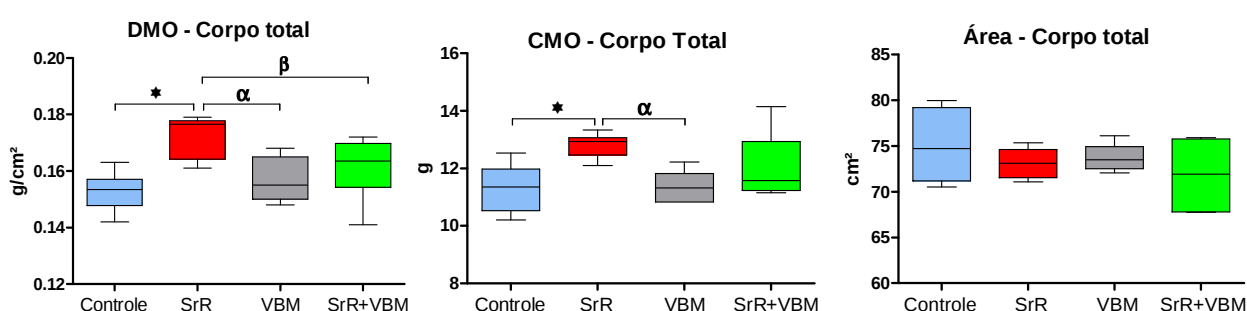


Figura 14. Gráficos de densitometria óssea da região do corpo total ao término do tratamento. Mediana ± Min.Max.

P<0,05. * s Controle. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

Tabela 6. Densitometria óssea ao término do tratamento – região do corpo total

	DMO (g/cm ²)	CMO (g)	Área (cm ²)
Controle	0,15 ± 0,01	11,11 ± 1,01	72,85 ± 5,99
SrR	0,18 ± 0,01 ^{*$\alpha\beta$}	12,88 ± 0,89 ^{*α}	72,50 ± 4,35
VBM	0,16 ± 0,01	11,38 ± 0,52	72,99 ± 2,39
SrR+VBM	0,16 ± 0,01	11,70 ± 1,36	72,48 ± 5,54

Dados expressos em média ± desvio padrão. ^{*} vs Controle. ^{α} vs VBM. ^{β} vs SrR+VBM.

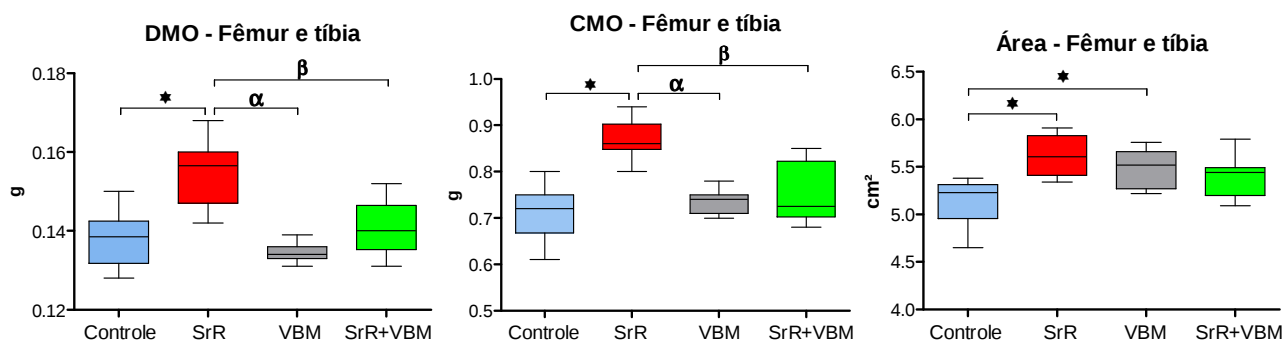


Figura 15. Gráficos de densitometria óssea da região do fêmur-tíbia ao término do tratamento. Mediana $\pm$ Min.Max.

$P < 0,05$. * vs Controle. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

Tabela 7. Densitometria óssea ao término do tratamento – região do fêmur-tíbia

	DMO (g/cm ²)	CMO (g)	Área (cm ²)
Controle	0,14 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,05	5,12 $\pm$ 0,26
SrR	0,15 $\pm$ 0,01 $\alpha\beta$	0,87 $\pm$ 0,04 $\alpha\beta$	5,60 $\pm$ 0,21 *
VBM	0,13 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 0,03	5,48 $\pm$ 0,20 *
SrR+VBM	0,14 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,06	5,32 $\pm$ 0,31

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * vs Controle. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

4.4. Propriedades biofísicas das vértebras e tíbias

Nas vértebras os parâmetros que apresentaram diferenças foram à densidade mineral e o percentual de material orgânico. A maior densidade mineral foi observada nos grupos SrR e SrR+VBM comparados ao Controle e VBM, e quantidade de material orgânico foi maior nos grupos SrR e SrR+VBM somente em relação ao Controle (figura 16 e tabela 8).

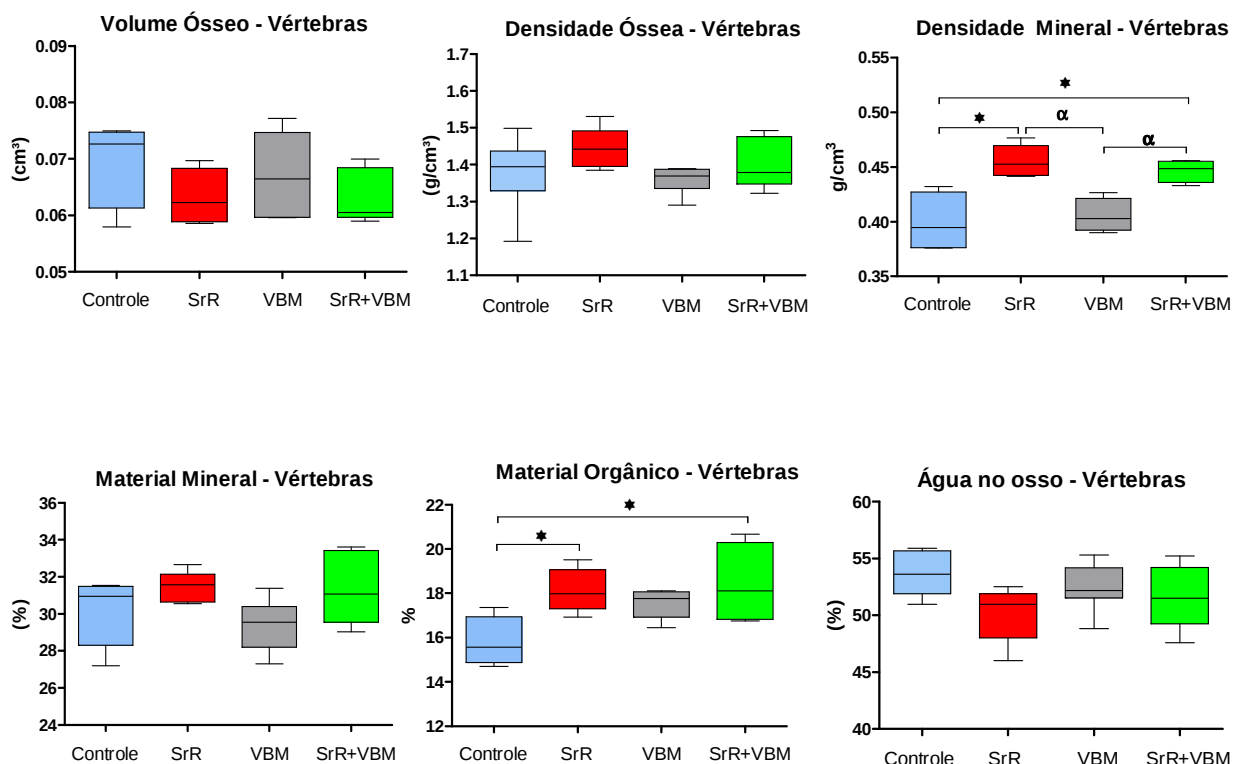


Figura 16. Gráficos das propriedades biofísicas das vértebras. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. * vs Controle. α vs VBM.

Tabela 8. Propriedades biofísicas das vértebras

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
Volume Ósseo (cm³)	0,08 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
Densidade Óssea (g/cm³)	1,38 $\pm$ 0,10	1,44 $\pm$ 0,05	1,36 $\pm$ 0,04	1,41 $\pm$ 0,06
Densidade Mineral (g/cm³)	0,39 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,05 [*] α	0,41 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02 [*] α
Água no Osso (%)	53,76 $\pm$ 0,02	50,14 $\pm$ 0,02	52,43 $\pm$ 0,02	51,35 $\pm$ 0,03
Material Orgânico (%)	16,14 $\pm$ 0,01	17,91 $\pm$ 0,01 [*]	17,67 $\pm$ 0,01	17,40 $\pm$ 0,01 [*]
Material Mineral (%)	30,10 $\pm$ 0,02	32,24 $\pm$ 0,02	29,91 $\pm$ 0,02	31,42 $\pm$ 0,02

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * vs Controle. α vs VBM.

Nas tíbias diferenças foram encontradas nos parâmetros de volume ósseo, material orgânico, material mineral e água no osso. O volume ósseo foi maior nos grupos VBM e SrR em relação ao Controle. O grupo VBM apresentou maior percentual de material orgânico quando comparado aos grupos Controle e SrR, o

percentual de material mineral foi maior no grupo SrR+VBM comparado ao VBM e o percentual de água no osso foi maior no grupo Controle comparado ao SrR+VBM e SrR (figura 17 e tabela 9).

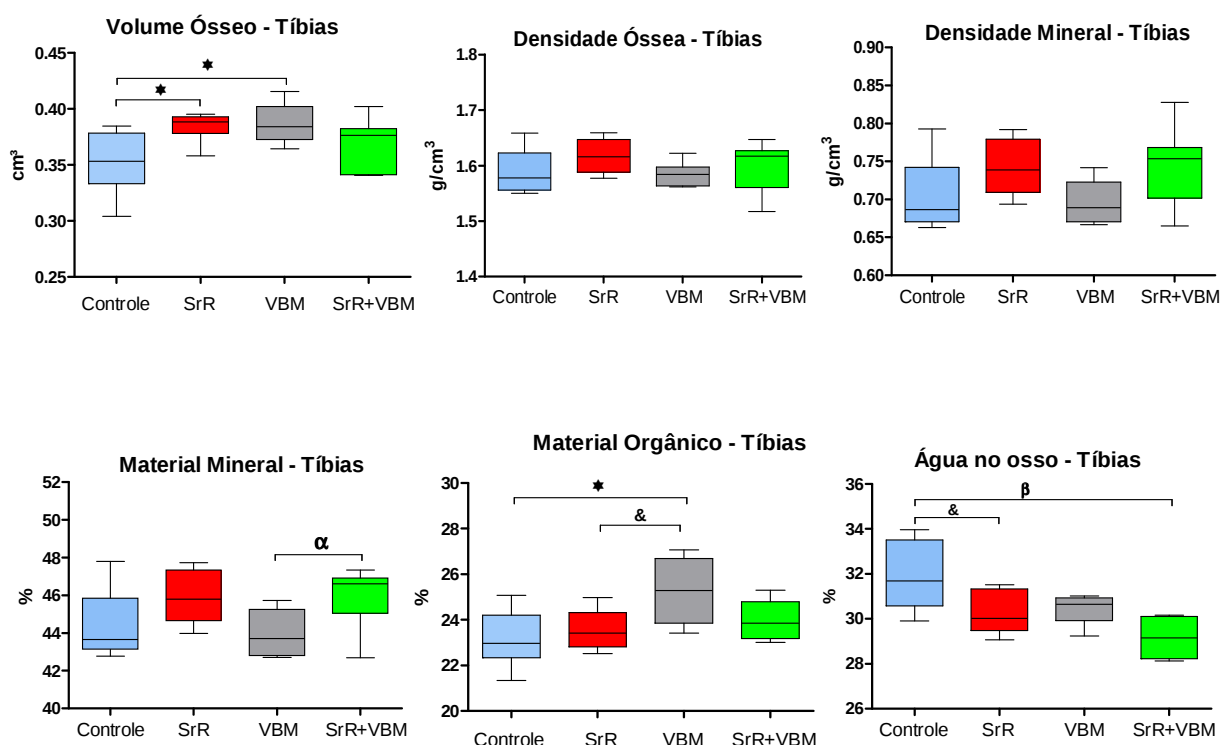


Figura 17. Gráficos das propriedades biofísicas das tíbias. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. * vs Controle. & vs SrR. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

Tabela 9. Propriedades biofísicas das tíbias

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
Volume Ósseo (cm³)	0,36 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02 *	0,38 $\pm$ 0,02 *	0,37 $\pm$ 0,03
Densidade Óssea (g/cm³)	1,59 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,03	1,58 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,07
Densidade Mineral (g/cm³)	0,71 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,05
Água no Osso (%)	32,01 $\pm$ 2,03 β	30,35 $\pm$ 0,02	30,90 $\pm$ 0,01	30,45 $\pm$ 0,03
Material Orgânico (%)	23,51 $\pm$ 1,39	23,53 $\pm$ 0,01	25,26 $\pm$ 0,01 *	23,83 $\pm$ 0,01
Material Mineral (%)	44,48 $\pm$ 1,70	45,81 $\pm$ 0,01	43,84 $\pm$ 0,01	45,97 $\pm$ 0,02 α

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * vs Controle. & vs SrR. β vs SrR+VBM.

4.5. Propriedades biomecânicas das tíbias e vértebras

Nas tíbias a rigidez, carga máxima e tenacidade foram maiores no grupo SrR quando comparado ao Controle e VBM. Somente o grupo SrR apresentou maior rigidez quando comparado ao SrR+VBM (figura 18 e tabela 10). Em relação à resiliência e a carga no ponto de fratura não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados.

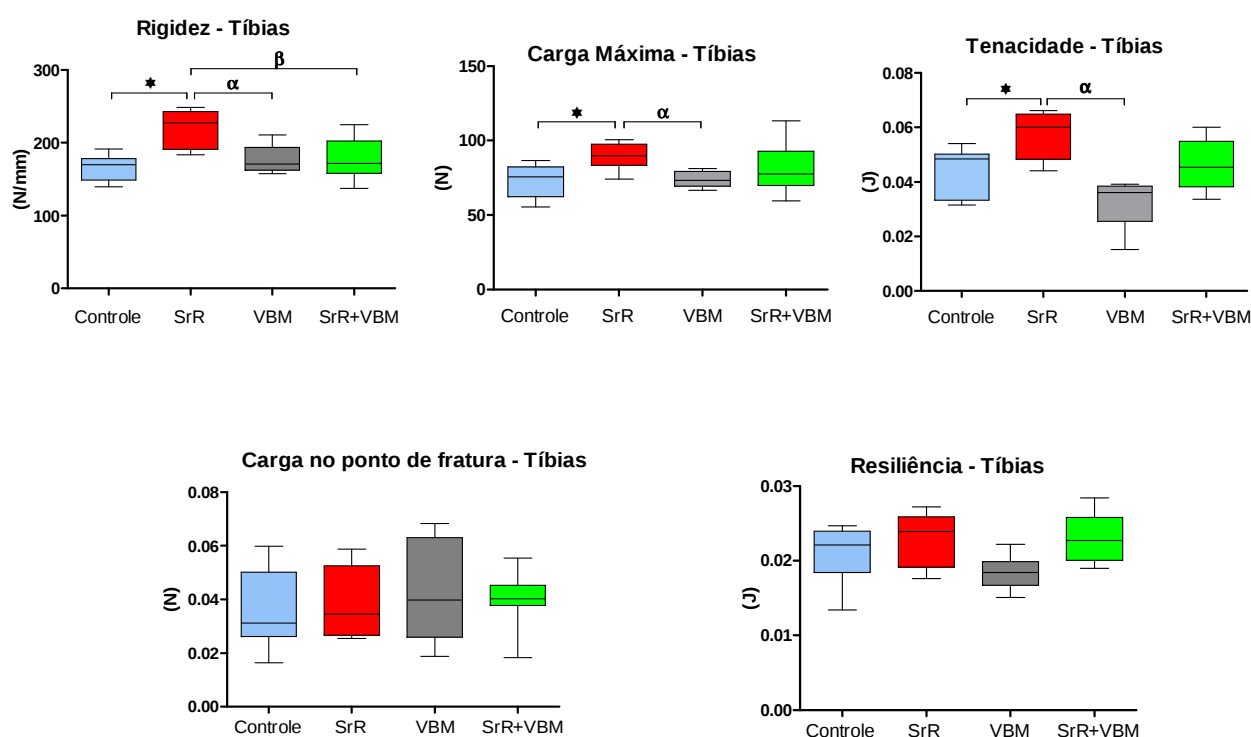


Figura 18. Gráficos das propriedades biomecânicas das tíbias. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. * vs Controle. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

Tabela 10. Propriedades biomecânicas das tíbias

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
Carga Máxima (N)	76,53 ± 8,14	89,26 ± 8,08 ^{*α}	73,37 ± 5,25 [*]	81,94 ± 6,47
Resiliência (J)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Tenacidade (J)	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01 ^{*α}	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,02
Rigidez (N/mm)	172,73 ± 6,66	217,51 ± 7,88 ^{*αβ}	176,68 ± 20,20	175,80 ± 39,06
Carga na Fratura (N)	0,04 ± 0,01	0,10 ± 0,19	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,02

Dados expressos em média ± desvio padrão. ^{*} vs Controle. ^α vs VBM. ^β vs SrR+VBM.

As análises realizadas nas vértebras mostraram que a carga máxima e a tenacidade foram maiores nos grupos Controle, SrR e SrR+VBM comparados ao grupo VBM, já a rigidez foi maior no grupo SrR quando comparado somente aos grupos Controle e VBM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros de resiliência e deslocamento máximo (figura 19 e tabela 11).

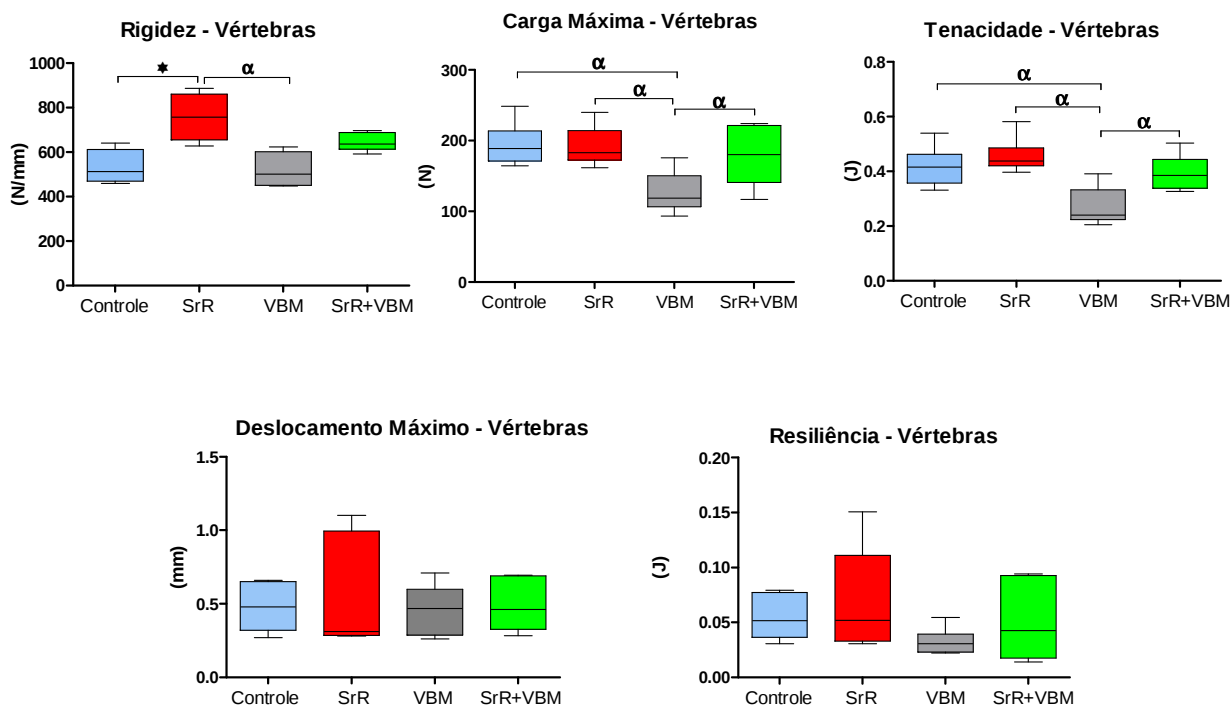


Figura 19. Gráficos das propriedades biomecânicas das vértebras. Mediana ± Min.Max. P<0,05. ^{*} vs Controle. ^α vs VBM.

Tabela 11. Propriedades biomecânicas das vértebras

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
Carga Máxima (N)	83,50 ± 15,14	185,35 ± 18,13 ^α	125,47 ± 28,66 [*]	176,20 ± 39,20 ^α
Resiliência (J)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,03
Tenacidade (J)	0,39 ± 0,05 ^α	0,44 ± 0,03 ^α	0,28 ± 0,07	0,38 ± 0,04 ^α
Rigidez (N/mm)	531,65 ± 77,99	757,43 ± 7,41 [*] ^α	518,50 ± 80,70	634,07 ± 77,85
Desloc. Máximo mm)	0,54 ± 0,14	0,65 ± 0,41	0,49 ± 0,19	0,55 ± 0,16

Dados expressos em média ± desvio padrão. ^{*} vs Controle. ^α vs VBM.

4.6. Histomorfometria

O volume ósseo trabecular BV/TV (%) do grupo VBM foi menor do que todos os outros grupos, entretanto o grupo SrR foi o único que apresentou maior volume trabecular quando comparado ao grupo Controle, mas não em relação ao SrR+VBM. Quando avaliamos a espessura do osso cortical observamos que tanto o tratamento com SrR isolado e quando associado a VBM foram maiores que o grupo Controle e VBM, e não foram observadas diferenças entre esses dois tratamentos.

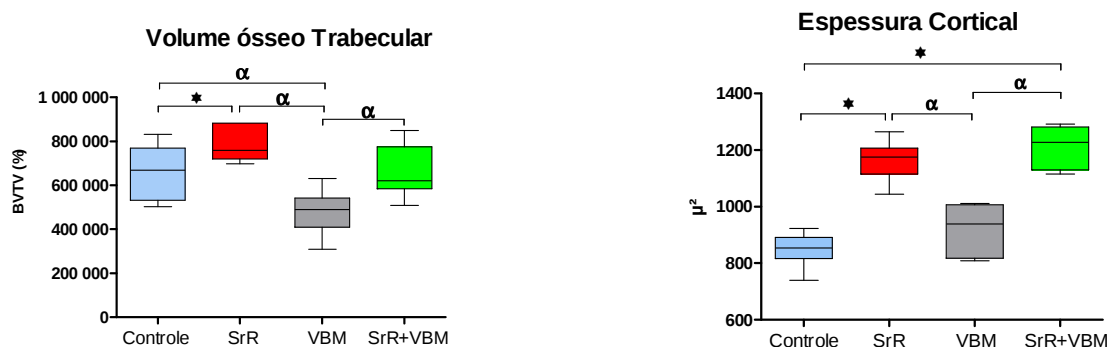


Figura 20. Gráficos de volume ósseo trabecular e espessura do osso cortical. Mediana ± Min.Max. P<0,05. ^{*} vs Controle. ^α vs VBM.

Tabela 12. Volume Ósseo trabecular e espessura do osso cortical

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
BV/TV (%)	23,09 ± 4,16 ^α	25,06 ± 4,27 ^{*α}	14,14 ± 0,05	21,67 ± 0,06 ^α
Ct.Wi (μm)	847,05 ± 58,33	1164,23 ± 72,17 ^{*α}	920,74 ± 87,86	1210,11 ± 77,73 ^{*α}

Dados expressos em média ± desvio padrão. ^{*} vs Controle. ^α vs VBM.

Figura 21 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fragmentos do osso fêmur distal de ratos fêmeas *Wistars* osteopênicos com 12 meses de idade evidenciados por H.E. **A – Grupo Controle.** Notar menor área trabecular e espessura do osso cortical quando comparado aos grupos SrR e SrR+VBM. **B – SrR.** Observar maior espessura do osso cortical que os grupos Controle e VBM. **C – Grupo VBM.** Notar menor área óssea trabecular e espessura do osso cortical comparado ao SrR e SrR+VBM. **D – Grupo SrR+VBM.** Observar maior área óssea trabecular e espessura do osso cortical que os grupos Controle e VBM. **Ct:** osso cortical; **Gp:** disco epifisário; **Ma:** medula óssea; **Tb:** osso trabecular.

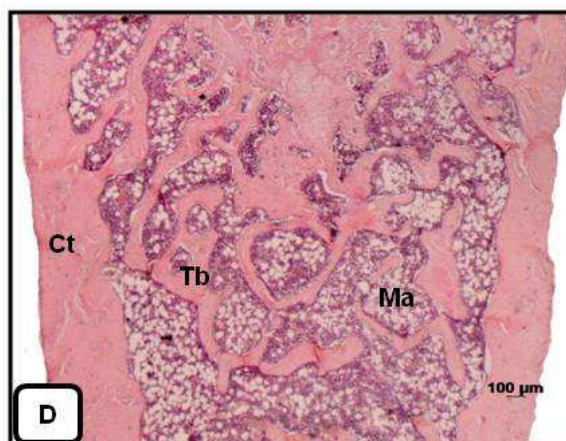
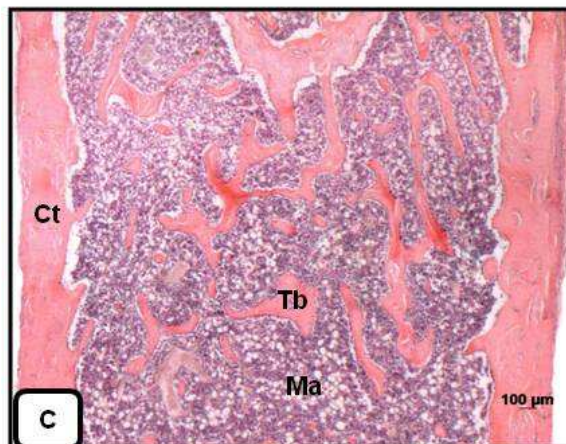
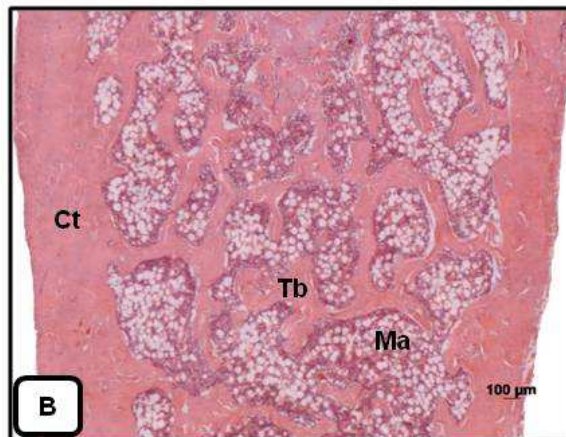
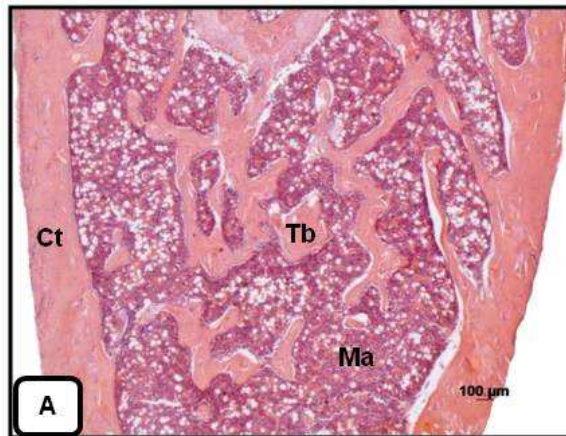
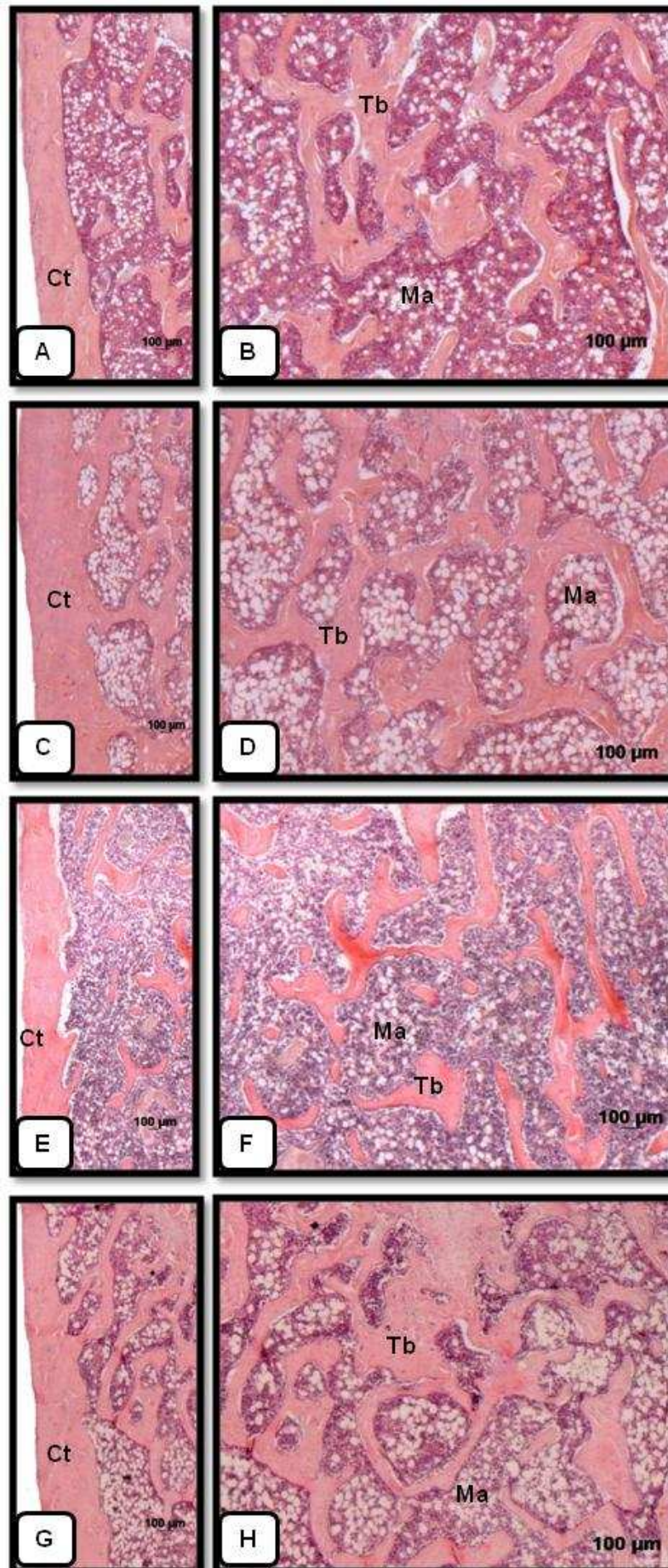


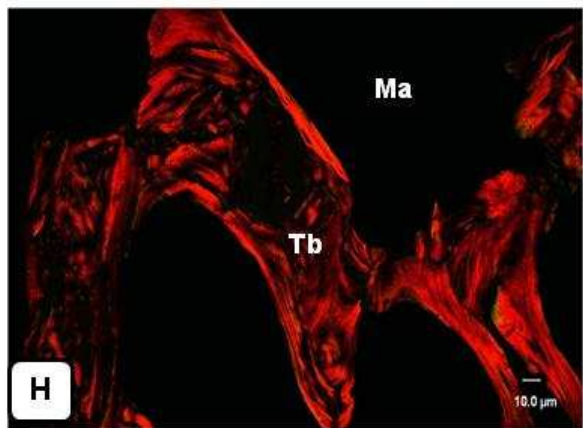
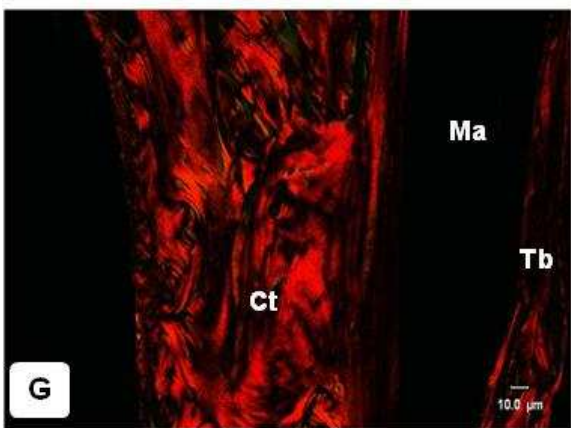
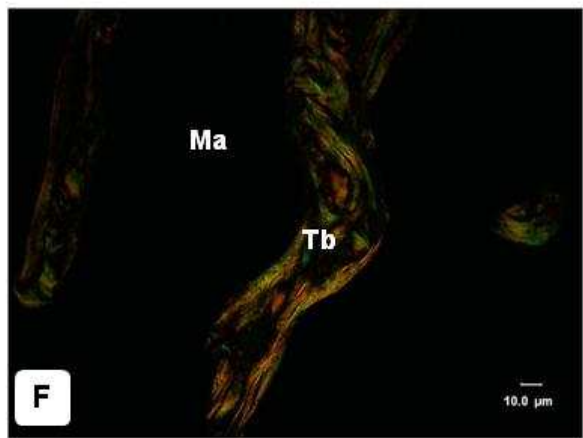
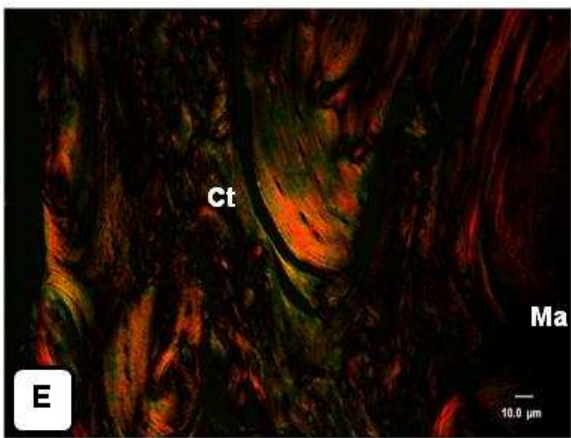
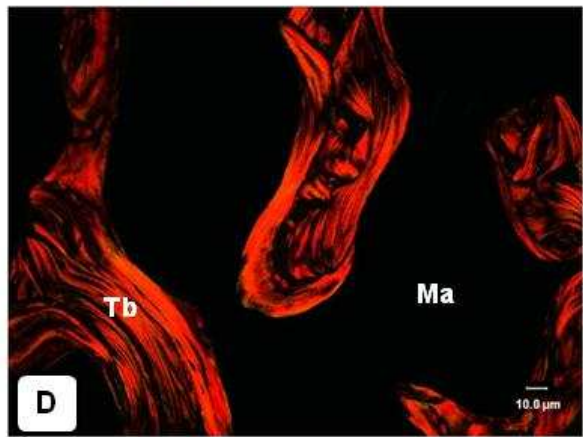
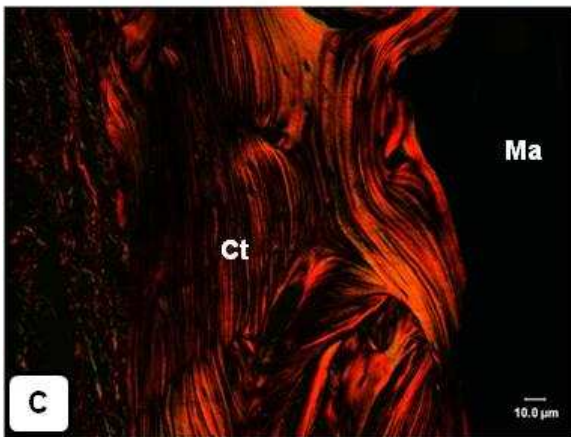
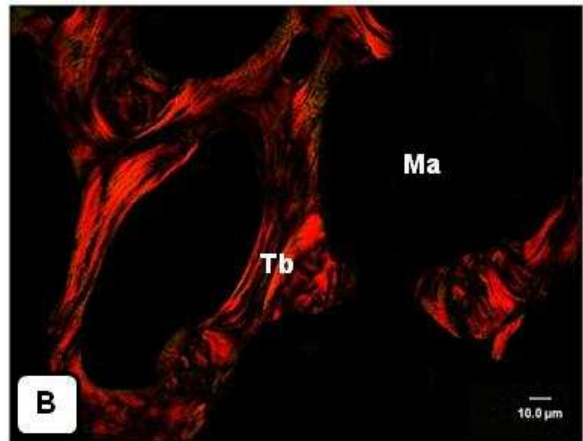
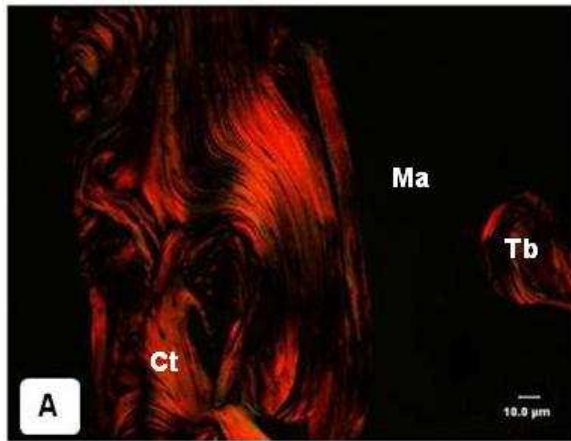
Figura 22 – Fotomicrografias de cortes histológicos do fragmento do osso fêmur distal de ratos fêmeas *Wistars* osteopênicos com 12 meses de idade evidenciados pelo H.E. **A e B. Grupo Controle. C e D. Grupo SrR. E e F. Grupo VBM. G e H. Grupo SrR+VBM.** Observar em C e G a maior espessura do osso cortical em relação ao **A** e **E**. Notar em **B, D** e **E** maior volume ósseo trabecular em relação a **E**. Observar em **D** que o grupo SrR apresentou maior volume ósseo trabecular em relação ao Controle (**B**). **Tb**: Trabécula; **Ct**: osso cortical; **Ma**: medula óssea.



4.7. Picro-sirius red

As análises de colágeno mostraram que os grupos SrR e SrR+VBM apresentaram maior birrefringência avermelhada do que os outros grupos, sendo mais expressiva no SrR+VBM e menos no VBM, tanto na região cortical quanto trabecular. O grupo VBM apresentou a maior birrefringência esverdeada entre todos os grupos estudados, tanto na região trabecular quanto na região cortical, e o grupo que exibiu a menor birrefringência esverdeada foi o SrR+VBM.

Figura 23. Fotomicrografias de cortes histológicos do fragmento do osso fêmur distal de ratos fêmeas *Wistars* osteopênicos com 12 meses de idade evidenciados com picrossirius red e visualizados ao microscópio de luz polarizada. Visão das regiões cortical e trabecular de todos os grupos mostrando a predominância da birrefringência avermelhada e esverdeada. **A e B. Grupo Controle. B e C. Grupo SrR. D e E. Grupo VBM. F e G. Grupo SrR+VBM.** Observar em **E e F** a maior intensidade da birrefringência esverdeada, correspondente ao grupo VBM. Em **G e H** a maior intensidade da birrefringência avermelhada que corresponde ao grupo SrR+VBM. **Tb:** Trabécula; **Ct:** osso cortical; **Ma:** medula óssea.



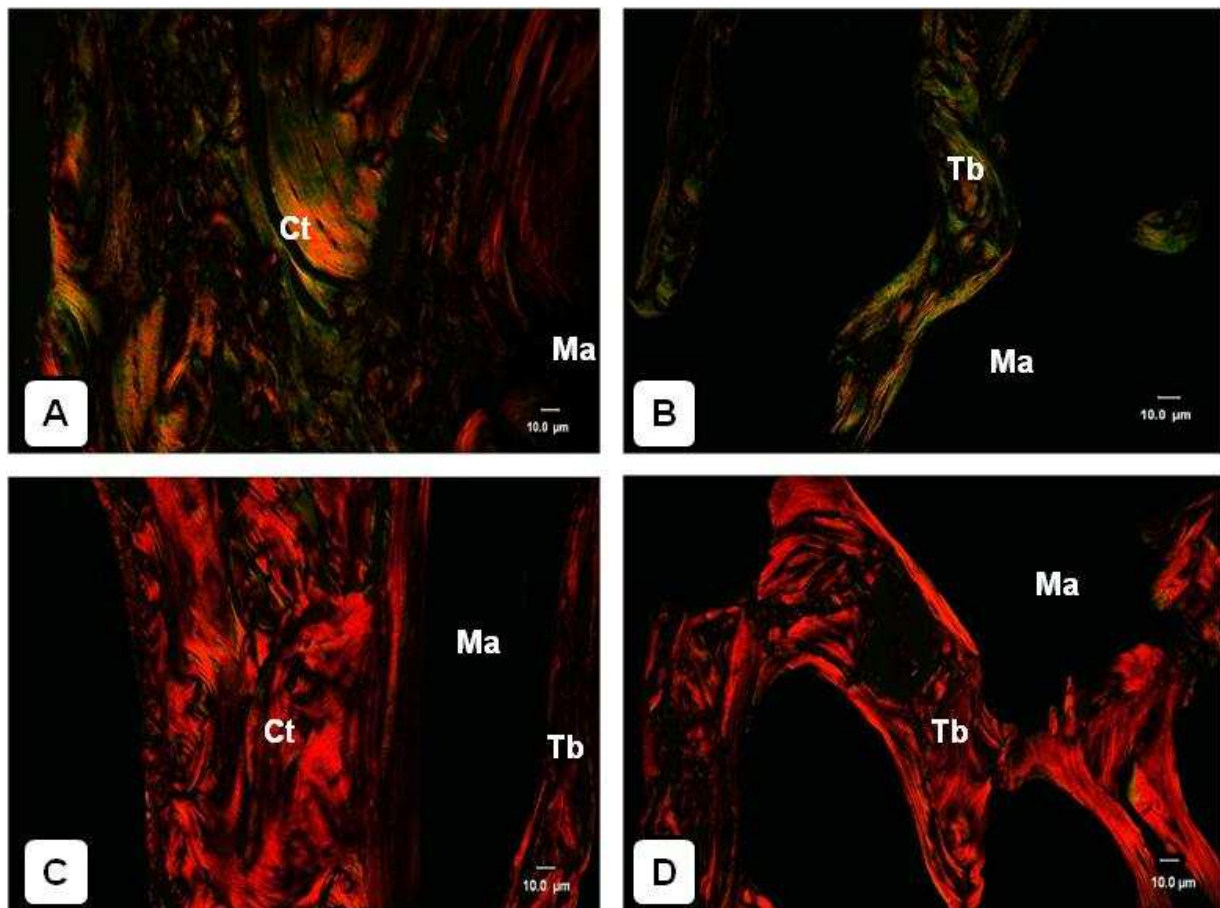


Figura 24. Fotomicrografias de cortes histológicos do fragmento do osso fêmur distal de ratos fêmeas *Wistars* osteopênicos com 12 meses de idade evidenciados com picrosirius red e visualizados ao microscópio de luz polarizada. Visão das regiões cortical e trabecular dos grupos VBM (A e B) e SrR+VBM (GIV). **A e C. Região cortical. B e D. Região trabecular.** Fotomicrografias dos grupos que apresentaram a maior birrefringência esverdeada (VBM) e avermelha (GIV) entre todos os estudados. **Tb:** Trabécula; **Ct:** osso cortical; **Ma:** medula óssea.

4.8. TRAP

O grupo que recebeu o tratamento com a terapia combinada (SrR+VBM) apresentou o maior número de osteoclastos TRAP positivos na região trabecular. Já na região cortical não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (figura 25, tabela 15). Ao avaliarmos cada grupo proporcionalmente, foi verificado que na região trabecular o grupo SrR apresentou 19% menos osteoclastos que o Controle, e os grupos SrR+VBM e VBM tiveram 33% e 43% mais osteoclastos que o Controle. Entre os grupos tratados, tanto o VBM quanto o SrR+VBM tiveram mais osteoclastos que o SrR, 75% e 65% respectivamente, e o SrR+VBM mostrou 6% menos osteoclastos que o VBM.

Na região cortical todos os tratamentos (SrR, VBM e SrR+VBM) foram positivos, diminuindo o número de osteoclastos, onde os grupos SrR, VBM e SrR+VBM tiveram 31%, 29% e 37% respectivamente. Entre os grupos tratados, o SrR apresentou 8% mais osteoclastos que o SrR+VBM e 11% mais que o VBM.

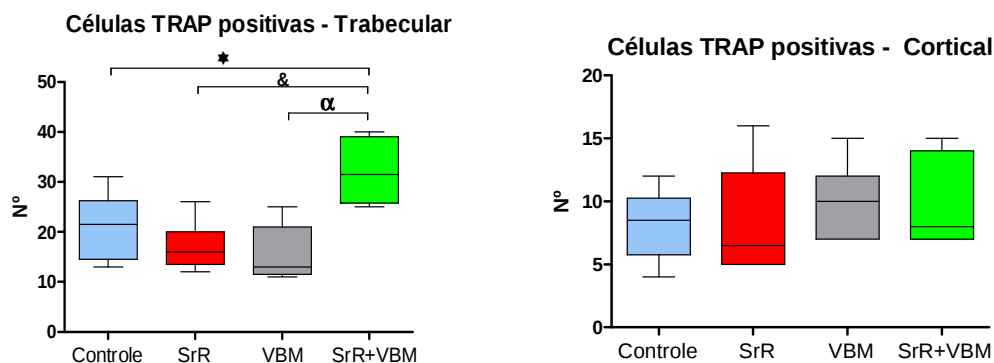


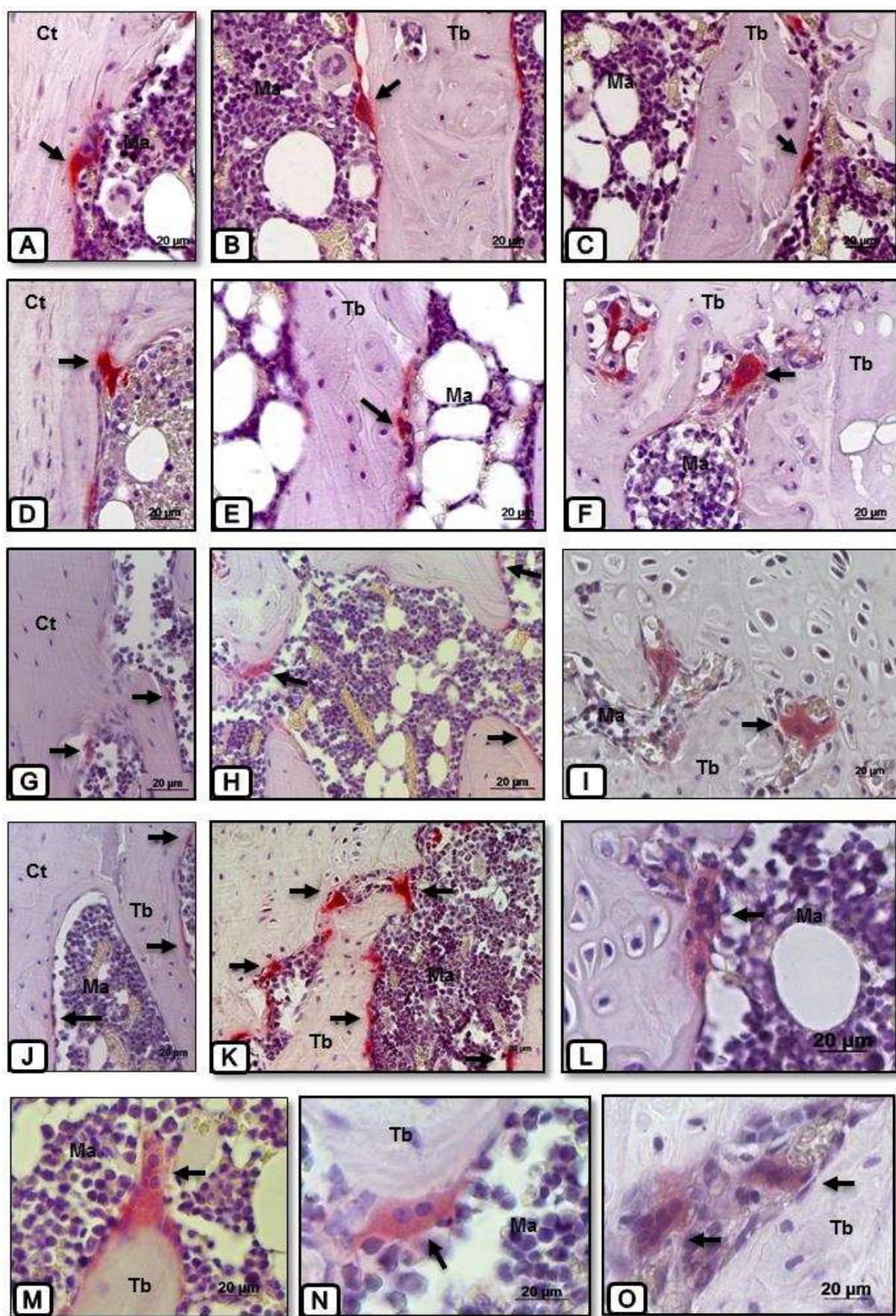
Figura 25. Gráficos das células TRAP-positivas no fêmur distal. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. & vs SrR. α VS VBM.

Tabela 13. Células TRAP positivas – Osteoclastos

Grupos	Controle	SrR	VBM	SrR+VBM
Trabecular	22,62 ± 17,31	19,92 ± 8,12	19,73 ± 11,73	28,33 ± 13,57 ^{★&α}
Cortical	7,62 ± 3,25	7,23 ± 5,18	6,53 ± 4,70	7,00 ± 5,66

Dados expressos em média ± desvio padrão. [★] vs Controle. [&] vs SrR. ^α vs VBM.

Figura 26- Fotomicrografias de cortes histológicos do fragmento do osso fêmur distal de ratos fêmeas *Wistars* osteopênicos com 12 meses de idade submetidas ao método de TRAP. **A, B e C. Grupo Controle. D, E e F. Grupo SrR. G, H e I. Grupo VBM. J, K e L. Grupo SrR+VBM.** As figuras **A, D, G e J** ilustram a região cortical e as figuras **B, C, E, F, H, I, K e L** ilustram a região trabecular. As figuras de **M a O** são detalhes das células TRAP-positivas (osteoclastos) dos grupos SrR, VBM e SrR+VBM. As setas indicam a localização das células TRAP-positivas (osteoclastos) no tecido ósseo. Observar no grupo SrR+VBM nas figuras **J e K** a maior quantidade de células TRAP-positivas (setas) em relação ao grupo Controle na região trabecular. Observar nas figuras **I, L e O** a grande quantidade de núcleos dos osteoclastos. **Tb**: Trabécula; **Ct**: osso cortical; **Ma**: medula óssea.



4.9. Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados no fêmur

Os géis de eletroforese em agarose para a quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados no osso fêmur revelaram a migração eletroforética na altura da banda do condroitim sulfato. Não houve detecção de dermatam e heparam sulfato. Ao avaliar a quantificação de condroitim sulfato foi observado que os grupos SrR, VBM e SrR+VBM apresentaram menor quantidade em relação ao grupo Controle (figura 22 e tabela 13).

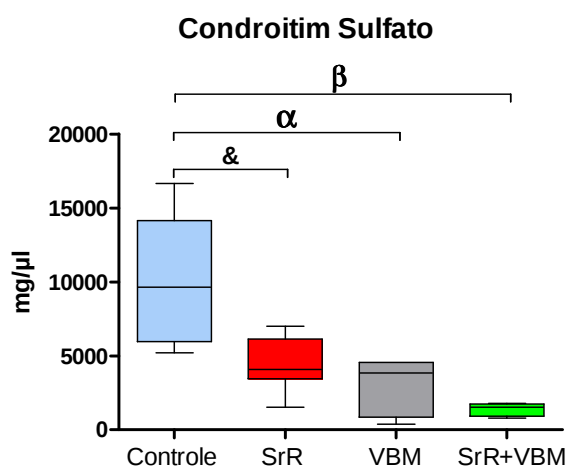


Figura 27. Gráfico de Condroitim Sulfato no fêmur. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. & vs SrR. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

Tabela 14. Glicosaminoglicanos (Condroitim Sulfato)

Grupos	$\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido
Controle	$10.286 \pm 4.521^{\&\alpha\beta}$
SrR	4.443 ± 1.757
VBM	3.014 ± 1.845
SrR+VBM	2.041 ± 1.872

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. & vs SrR. α vs VBM. β vs SrR+VBM.

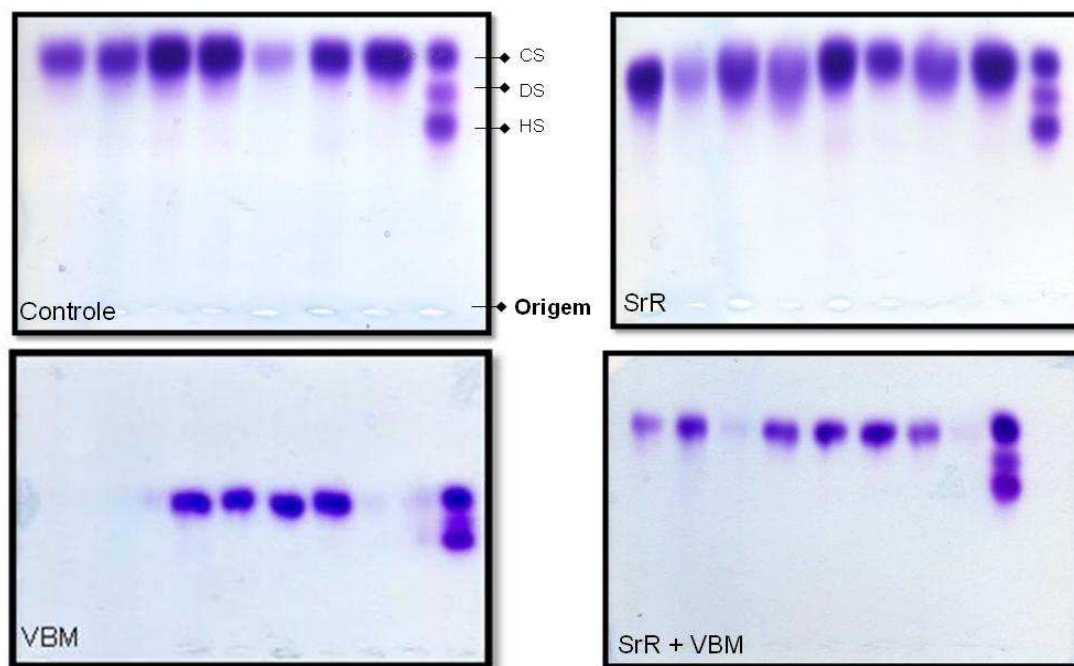


Figura 28. Perfil eletroforético dos glicosaminoglicanos sulfatados evidenciando a migração na altura do Condroitim Sulfato (CS).

4.10. Ácido hialurônico

Após a análise realizada para a quantificação de ácido hialurônico foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados. O grupo VBM apresentou o maior nível de ácido hialurônico comparado aos outros grupos, e o grupo SrR+VBM o menor (figura 24 e tabela 14).

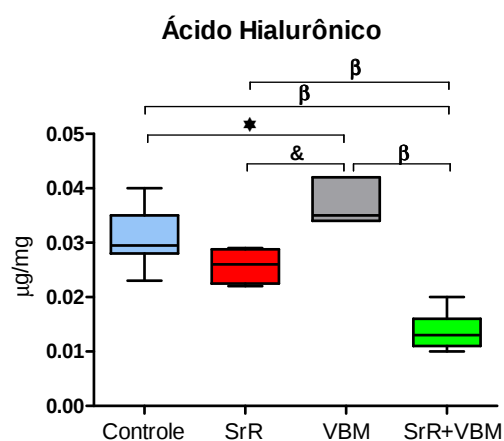


Figura 29. Gráfico dos níveis de Ácido Hialurônico no fêmur distal. Mediana $\pm$ Min.Max. $P < 0,05$. * vs Controle. & vs SrR. β vs SrR+VBM.

Tabela 15. Ácido Hialurônico (AH)

Grupos	µg/mg de tecido
Controle	0,033 $\pm$ 0,004 ^{β}
SrR	0,026 $\pm$ 0,003 ^{β}
VBM	0,026 $\pm$ 0,013 ^{*β}
SrR+VBM	0,022 $\pm$ 0,016

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * vs Controle. & vs SrR. β vs SrR+VBM.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e frequência no tecido ósseo de ratas osteopênicas. Utilizamos o ranelato de estrôncio na dose de 625mg com base nos achados já descritos na literatura por corresponder à dose de 2g utilizada em humanos no tratamento para a osteoporose, por equivaler aproximadamente ao nível da concentração de estrôncio encontrada no sangue durante pesquisas com SrR (Marie et al., 1993; Ammann et al., 2004; Meunier et al., 2004; Marie et al., 2008, Bain et al., 2009; Habermann et al., 2010). Essa correlação de dosagem não é feita com base no peso, mas sim, no metabolismo e absorção do medicamento (Marie et al., 2011; Campo et al., 2013).

Trabalhos na literatura sugerem que frequências vibratórias variando entre 15 e 90 Hz podem exercer efeito anabólico sobre o tecido ósseo (Rubin et al., 2002; Oliveira et al., 2010), desta forma optamos por utilizar a frequência de 60 Hz. Porém um consenso entre a frequência e intensidade ideais de vibração mecânica ainda não estão bem estabelecidos (Burr et al., 1997; Fritton et al., 2001; Pope et al., 2003; Oliveira et al., 2010).

A cirurgia de ooforectomia tem sido utilizada para se obter o modelo osteopênico em animais (Kalu, 1991; Marie et al., 1993; Bain et al., 2009; Li et al., 2010; Ozturan et al., 2011), entretanto a maioria dos estudos realizados com SrR ou VBM iniciam o tratamento logo após a ooforectomia (Arlot et al., 1992; Marie et al., 1993; Flieger, et al., 1998; Judex et al., 2007; Bain et al., 2009; Li et al., 2010). É sabido que neste modelo o tratamento funciona mais como uma prevenção a osteopenia, e não como um tratamento propriamente dito. Somado ao fato de existirem poucos trabalhos sobre a espera de 3 meses após a ooforectomia para que ocorra a perda óssea (Tezval et al., 2011), não foram encontrados na literatura trabalhos que associem o tratamento com ranelato de estrôncio a vibração mecânica como uma possível terapêutica para osteoporose.

Em nosso estudo os animais foram semanalmente pesados de maneira individual e os primeiros dados referentes à massa corporal foram coletados no início do experimento ao realizarmos a separação dos grupos e, a última pesagem ocorreu no dia da eutanásia. Constatamos ganho de massa corporal em todos os grupos após

a ooforectomia até o início do tratamento. Não foram observadas alterações na massa corporal de todos os grupos durante o período de tratamento. O ganho de massa corporal após a cirurgia de ooforectomia está bem documentado na literatura (Kalu, 1991; Ishimi et al., 1999; Kim & Om, 2001; Paik et al., 2003; Brouwers et al., 2010). Esse aumento na massa corporal tem sido atribuído a um decréscimo no metabolismo basal e não a um maior consumo de alimentos (Deyhim et al., 2003). Entretanto, poucos trabalhos verificaram alterações na massa corporal durante o tratamento com SrR (Delannoy et al., 2002; Bain et al., 2009) e com VBM (Jankovich, 1972; Flieger et al., 1998), além disso não há relatos na literatura referentes aos tratamentos administrados de forma combinada.

Diferenças na massa corporal também não foram observadas por Bain et al. (2009) em ratas tratadas com SrR, porém o tratamento realizado pelos autores foi a longo prazo (13 meses) e o modelo de estudo foram ratas *Sprague-Dawley*, com o início do tratamento logo após a ooforectomia. Delannoy et al. (2002) trataram animais a longo prazo e verificaram o aumento da massa corporal no segundo ano no grupo que recebeu a maior dose de SrR, contudo os autores utilizaram camundongos machos e fêmeas e doses diferentes da utilizada em nosso estudo (200, 600 e 1.800mg/kg/dia).

Flieger et al. (1998) também não observaram diferenças em relação ao ganho de massa dos animais submetidos a vibração mecânica, porém na literatura não existe um consenso a respeito dos efeitos de estímulos mecânicos sobre a massa corporal de animais ooforectomizados (Nordsletten et al., 1994; Zhang et al., 2001).

As análises biométricas não revelaram diferenças em relação ao comprimento dos fêmures. Marie e colaboradores (1993) ao analisarem o fêmur de ratas *Sprague-Dawley* com 3 meses de idade, tratadas logo após a ooforectomia com SrR por 60 dias e também não encontraram diferenças em relação ao comprimento dos fêmures. Em um estudo realizado por Ammann et al. (2004) tanto em machos como em fêmeas foi observado o aumento no comprimento dos fêmures no grupo tratado com SrR, entretanto neste experimento o tratamento foi realizado por 104 semanas, diferente do realizado em nosso estudo. Nos resultados referentes à espessura dos fêmures pudemos observar que o grupo SrR foi o que apresentou a maior espessura comparado aos outros grupos. Também no estudo de Ammann et al. (2004) foi notado o aumento na espessura do fêmur em ratas Fisher não ooforectomizadas de 6 a 7 semanas, entretanto o tratamento foi realizado a longo prazo (104 semanas) com SrR

nas doses de 450 e 900mg/Kg/dia. Esse aumento observado na espessura foi associado à maior resistência óssea.

Nas tíbias os resultados foram mais expressivos do que os observados nos fêmures. Os grupos que foram submetidos ao tratamento com VBM e também a terapia combinada (SrR+VBM), apresentaram maior espessura e comprimento comparados ao Controle, e somente o grupo VBM mostrou comprimento superior ao grupo SrR.

Após avaliação dos resultados obtidos comparando cada grupo no início e ao final do tratamento, constatamos que o tratamento com SrR de forma isolada foi mais efetivo nos parâmetros avaliados por densitometria óssea, pois o grupo submetido a esse tratamento foi o único a obter ganho na DMO, CMO e Área, tanto na região de corpo total, como na região do fêmur-tíbia refletindo, como mostrado nas análises biomecânicas que serão discutidas mais adiante em maior rigidez e maior capacidade em suportar cargas, sugerindo maior capacidade em resistir a grandes deformações antes de fraturar. Este grupo também apresentou à maior DMO e CMO nas duas regiões analisadas quando comparamos todos os grupos ao término do tratamento, e maior área do que o grupo Controle na região do fêmur-tíbia.

O grupo submetido à VBM apresentou perda de DMO na região do fêmur-tíbia, porém apresentou maior área comparado ao grupo Controle, na mesma região ao término do tratamento. Acreditamos que se o período de tratamento com VBM fosse estendido ou realizado logo após a OVX (forma preventiva), talvez pudéssemos ter observado efeito positivo na DMO neste grupo, como apontam alguns trabalhos na literatura (Flieger et al., 1998; Judex et al., 2007). Corroboram com essa ideia os resultados obtidos com as análises biométricas nas tíbias (discutidas anteriormente).

É sabido que o estrôncio pode incorporar-se ao tecido ósseo (Boivin et al., 1996; Dahl et al., 2001) e não podemos descartar a possibilidade do aumento observado na DMO do grupo SrR esteja relacionado a maior incorporação de estrôncio neste grupo, do que no grupo que além do estrôncio foi também submetido a VBM. De alguma forma, a Vibração parece atrasar o processo de mineralização, pois este parece mais evidente no grupo que recebeu apenas o tratamento com SrR, do que no grupo associado. Ressaltamos que este é o primeiro estudo utilizando SrR e VBM de forma associada como tratamento da osteopenia em animais OVX, estudos

complementares são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos de ação desses tratamentos no tecido ósseo.

Aumento da DMO foi observado por Ahmet-Camcioglu et al. (2009) em ratas *Sprague-Dawley*, ooforectomizadas e tratadas por 2 meses com SrR, porém o tratamento foi realizado de modo preventivo com início logo após a ooforectomia e com alta dose de SrR (1.800mg/kg/dia). Em estudos clínicos realizados com mulheres menopausadas tratadas com 2g de SrR verificou-se o aumento da DMO no colo do fêmur, na região vertebral e no quadril após 3 anos de tratamento (Meunier et al., 2004). Rizzoli et al. (2010) também notaram o aumento da DMO em mulheres osteoporóticas que foram tratadas com SrR e alendronato nas doses terapêuticas permitidas por um período de 2 anos.

Os resultados obtidos com as vértebras e as tíbias não foram similares em relação aos parâmetros biofísicos. Sabe-se que sítios esqueléticos distintos respondem de maneira diferente a determinados tipos de tratamentos, inclusive a própria vibração mecânica responde diferente aos sítios ósseos dependendo da frequência e intensidade de estímulos, pois essa resposta está relacionada à microarquitetura óssea da região estudada. Somado a isso, a proporção de osso trabecular e cortical nas regiões do fêmur e tíbia são diferentes, enquanto que nas vértebras essa proporção é mais homogênea (Breitman et al., 2003; Silva, 2011). Além disso, o processo de remodelação óssea ocorre com maior intensidade no osso trabecular do que no osso cortical, pois o osso trabecular é mais suscetível a alterações provocadas pela osteoporose (Riggs, Melton, 1998; World Health Organization, 1994; Silva, 2011).

Nas vértebras observamos que o tratamento combinado (SrR+VBM) e também com SrR de forma isolada levaram ao aumento da densidade mineral em relação ao Controle e VBM, e o conteúdo de material orgânico de ambos foi superior somente quando confrontados com o grupo Controle. Nas tíbias observamos maior volume ósseo no grupo VBM em relação ao Controle, e do percentual de material orgânico em relação ao Controle e também ao SrR. Os resultados biofísicos encontrados nas tíbias suportam nossos achados referentes aos parâmetros biométricos também encontrados nas tíbias. Aumento no percentual de material orgânico em animais ooforectomizados e submetidos à VBM também foi observado por Florêncio et al. (2013). Os grupos SrR e SrR+VBM apresentaram diminuição do

percentual de água no osso comparados ao Controle, essa diminuição pode ter ocorrido devido ao aumento do percentual de material orgânico, pois a água presente no osso pode ter dado lugar ao tecido ósseo neoformado. Pacheco-Costa (2010) também encontrou diminuição no percentual de água no osso em tíbias de animais OVX que apresentaram o maior percentual de material orgânico após tratamento com hPTH (1-34).

O aumento no porcentual de material orgânico observado nas tíbias do grupo VBM pode estar relacionado à maior presença de fibras colágenas delgadas (birrefringência esverdeada) conforme observado nos fêmures neste grupo, já nas vértebras o aumento observado nos grupos SrR e SrR+VBM pode estar relacionado também a presença de fibras colágenas, porém espessas (birrefringência avermelhada). Salientamos, no entanto que outros elementos que compõem a matriz orgânica podem ter cooperado para que ocorresse esse aumento. Estudos complementares são necessários.

Diante dos resultados obtidos com a densitometria óssea e os testes biofísicos realizamos o ensaio de compressão para as vértebras e o teste de flexão a 3 pontos para as tíbias afim de avaliar se o tratamento com SrR associado a VBM e de ambos de forma isolada poderia alterar alguns parâmetros que refletem na resistência dos ossos às fraturas.

Ao avaliarmos os resultados dos testes biomecânicos pudemos observar que o tratamento com SrR foi mais eficaz do que os outros tratamentos, principalmente nas tíbias. Apesar desses achados, observamos que a capacidade em suportar cargas nas vértebras do grupo SrR+VBM foi maior do que o grupo que recebeu somente o tratamento com VBM, somado a isso, não observamos diferenças na rigidez, na tenacidade e na capacidade em suportar cargas entre os grupos SrR e SrR+VBM nas vértebras, e desses dois últimos parâmetros também nas tíbias. Nas tíbias a maior rigidez observada no SrR em relação ao SrR+VBM pode ter ocorrido pelo fato do teste de flexão a 3 pontos ter sido realizado na diáfise, região composta principalmente por osso cortical. Isso pode explicar também porque as vértebras responderam melhor ao tratamento combinado.

Quanto a este tipo de teste, algumas considerações devem ser discutidas. Em grande parte dos trabalhos, o teste de flexão a três pontos é realizado na diáfise de ossos longos (Breitman et al. 2003; Picherit et al. 2001; Comelekoglu et al., 2007;

Washimi et al., 2007). Entretanto, estudos indicam que dependendo do osso em que este teste é realizado, os resultados podem variar. Breitman et al. (2003) observaram que o teste de flexão a três pontos realizados em diáfise de fêmures, não foi capaz de detectar diferenças significantes na carga máxima suportada pelo fêmur entre os grupos. No entanto, quando este mesmo teste foi realizado em vértebras lombares, os autores detectaram diferenças significantes nesse parâmetro entre os grupos (Silva, 2011).

É sabido que a rigidez é a capacidade da amostra para resistir a deformações e a carga máxima corresponde a maior carga suportada pelo osso durante o teste, já a tenacidade representa a energia necessária para provocar a ruptura do osso (Pastor, 2009). Deste modo, nossos resultados indicam que a maior capacidade de suportar carga refletiu no aumento da resistência óssea, sugerindo que o osso formado durante o tratamento com SrR isolado nas tíbias e associado a VBM nas vértebras é capaz de resistir a grandes deformações antes de fraturar.

O maior percentual de material orgânico observado nas tíbias do grupo VBM pode estar relacionado à sua menor capacidade em suportar cargas quando comparado ao grupo SrR. Acreditamos que a mineralização da matriz no grupo VBM não esteja totalmente completa devido ao período de tratamento, talvez se fosse estendido pudéssemos observar nesse grupo um estágio de mineralização mais avançado. Talvez, o teste de flexão a 3 pontos não é sensível o suficiente para detectar mudanças nessa fase pelo fato da inclusão de um agente anabólico ao tratamento com VBM, o que pode ter acelerado o processo de maturação do osso e por isso foram vistas alterações na resistência óssea.

Ammann et al. (2004 & 2007) também observaram aumento na rigidez e na capacidade em suportar cargas nas vértebras e fêmures de ratas *Fisher* com 2 meses de idade, mas somente no grupo que recebeu a dose de 900mg/kg/dia de SrR e após um período de 2 anos de tratamento. Observamos essas diferenças no grupo SrR com um curto período de tratamento e com dose inferior. Brouwers et al. (2010) estudaram ratas OVX submetidas ao tratamento com vibração mecânica por um período de 6 semanas, 20 minutos por dia, com 0.3 g a 90 Hz e não observaram alterações significantes nos parâmetros analisados com o teste de flexão a 3 pontos em tíbias. Contudo esse estudo foi realizado por período curto (6 semanas), diferente

do nosso onde o período de experimento foi de 12 semanas com frequência e intensidade diferentes.

Para melhor compreendermos a ação dos tratamentos na microarquitetura óssea realizamos análises histomorfométricas na região do osso trabecular e do osso cortical. Os resultados mostraram que o SrR isolado foi mais efetivo na região trabecular que o tratamento com VBM isolada, e não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo SrR+VBM. Desta forma, o tratamento com VBM na área trabecular não teve a mesma eficácia do que os tratamentos contendo ranelato de estrôncio. Novamente, acreditamos que o tempo de tratamento observado neste experimento não tenha sido suficiente para que a VBM pudesse reestabelecer a área óssea trabecular. Uma vez que o modelo animal de estudo foram ratas já maduras (6 meses).

É sabido que atividades físicas proporcionam aumento na massa e resistência óssea mostrando-se mais eficaz em crianças do que em indivíduos adultos. Além disso, a atividade física não mostra a mesma eficácia em relação à estrutura óssea quando comparamos com crianças (Forwood & Burr, 1993; Bassey et al., 1998; Silva, 2011). O decréscimo da eficácia tem sido atribuído à diminuição da sensibilidade do tecido ósseo a estímulos mecânicos com o avançar da idade (Rubin et al., 1992; Turner et al., 1995).

Marie et al. (1993) observaram que o tratamento com ranelato de estrôncio foi capaz de prevenir parcialmente a perda do volume ósseo nas tíbias de ratas ooforectomizadas e submetidas imediatamente ao tratamento com SrR. Deve-se salientar que o modelo de estudo, diferente do utilizado por Marie et al. (1993), tem como base modelos osteopênicos, onde primeiro é provocada a perda óssea e depois é iniciado o tratamento para tentar reverter o quadro de osteopenia.

Em relação à espessura do osso cortical foi verificado que essa região respondeu melhor ao tratamento combinado, pois a espessura observada nesse grupo foi superior a do grupo Controle e VBM, resultado também observado no grupo SrR. Rubinacci et al. (2008) observaram aumento significativo da área óssea cortical e medular e maior resistência a tensão no grupo submetido a vibração mecânica de 30 HZ, 3g, mostrando que a VBM tem efeito anabólico no tecido ósseo de animais ooforectomizados e, que o potencial osteogênico está limitado a modelação do córtex ósseo e dependa da amplitude de vibração aplicada.

Diferente dos nossos resultados, Sehmish et al. (2009) observaram efeito positivo da VBM sobre o osso trabecular como: aumento da área óssea, do número de nódulos trabeculares e do número de trabéculas quando comparado ao osso cortical de ratas *Sprague Dawley*, ooforectomizadas e submetidas a vibração mecânica a 90 Hz, duas vezes ao dia por 15 minutos, 7 dias por semana durante 35 dias. Neste estudo utilizamos uma frequência mais baixa (60 Hz) e por um período mais longo (90 dias), e constatamos efeitos positivos da VBM somente quando combinada ao tratamento com SrR.

Rubinacci et al. (2008) observaram aumento da área trabecular e também do osso cortical em tíbias de animais submetidos a vibração mecânica por 6 semanas, a 30 Hz, logo após o procedimento de OVX. Os diferentes resultados encontrados na literatura podem estar relacionados a diferentes frequências, intensidades e período de tratamento, pois não existe um consenso sobre quais são mais anabólicos (Burr et al., 1997; Fritton et al., 2001; Pope et al., 2003; Oliveira et al., 2010).

Bain e colaboradores (2009) ao utilizarem o SrR nas doses de 125, 250 e 625mg/kg/dia pelo período de 13 meses verificaram a prevenção da perda do volume ósseo em vértebras independente da dose, porém não observaram diferenças significantes em relação a espessura do osso cortical. Entretanto, o tratamento foi iniciado logo após a ooforectomia, diferindo novamente do modelo deste estudo que houve uma espera de 90 dias para obtenção do modelo osteopênico. Os resultados obtidos com o tratamento combinado (SrR+VBM) são inéditos, pois não há na literatura relatos sobre análises histomorfométricas em animais submetidos ao tratamento associado entre ranelato de estrôncio e vibração mecânica.

Considerando que pouco se sabe sobre a ação do SrR, da VBM e da associação entre esses dois tratamentos nos componentes da matriz óssea, buscamos avaliar seus efeitos em alguns componentes da parte orgânica dessa matriz. Dentre os componentes orgânicos, as fibras colágenas estão presentes em maior quantidade no tecido ósseo, desta forma buscamos avaliar possíveis alterações destas fibras após os tratamentos. O colágeno possui birrefringência e em reações histoquímicas utilizando-se Picro Sirius Red com posterior análise em microscópio de luz polarizada, as fibras colágenas podem apresentar-se esverdeadas ou avermelhadas.

Em 1980, Montes e colaboradores relataram as birrefringências do colágeno como sendo de tipos diferentes, assim as fibras mais finas e menos

birrefringentes apresentariam a birrefringência esverdeada e estariam relacionadas ao colágeno do tipo III, e as fibras mais espessas com birrefringência amarelada até o vermelho intenso (fibras avermelhadas) estariam relacionadas ao colágeno do tipo I (Montes & Junqueira, 1991). Foi relatado posteriormente que tanto a birrefringência esverdeada quanto a avermelhada poderiam ser o colágeno do tipo I, porém subdivididas em dois tipos de fibras: maduras e imaturas.

Dessa forma, as fibras colágenas do tipo I, ditas maduras são mais espessas e encontram-se aglomeradas, por isso aparecem com uma birrefringência desde o amarelo, passando pelo laranja até chegar ao vermelho intenso que é o colágeno mais maduro, já as fibras colágenas imaturas do tipo I são compostas de fibrilas finas dispostas espaçadamente e apresentam uma birrefringência esverdeada (Szendrői et al., 1984; Retamoso et al., 2009).

Poucos trabalhos na literatura científica investigaram a relação do ranelato de estrôncio a possíveis alterações no colágeno e esses trabalhos foram realizados *in vitro* (Canalis et al., 1996; Barbara et al., 2004). Além disso, não existem estudos na literatura científica que abordam a ação da vibração mecânica sobre as fibras colágenas, entretanto, em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa (Moura et al., 2014) foi observado em camundongos fêmeas OVX submetidos ao tratamento com VBM efeitos positivos sobre esse componente da matriz óssea. Os resultados apresentados neste estudo referente ao tratamento combinado (SrR+VBM) são inéditos, pois não existe nenhum trabalho na literatura relacionando esse tratamento ao colágeno.

A maior birrefringência avermelhada foi observada nos grupos SrR e SrR+VBM comparados aos outros grupos, sendo mais expressiva no grupo combinado, indicando a presença de fibras colágenas espessas (maduras). Provavelmente, o tratamento com a terapia combinada pode ter acelerado o turnover ósseo culminando em fibras mais espessas neste grupo. A birrefringência esverdeada presente em maior quantidade no grupo VBM em relação a todos os outros grupos, sugere uma maior quantidade de fibras colágenas delgadas (imaturas), o que pode estar relacionado a alterações na organização dessas fibras, indicando que um processo de remodelação óssea possa estar ocorrendo. Esse desarranjo pode acontecer quando há a diminuição de proteoglicanos ricos em condroitim sulfato (Corsi et al., 2002; Pacheco-Costa, 2010), o que corrobora com nossos achados que serão discutidos adiante.

Acreditamos que o grupo VBM esteja em um estágio anterior no processo de remodelação óssea, e os grupos SrR e SrR+VBM em um estágio mais avançado. Campos (2013) também observou em animais OVX tratados com diferentes doses de SrR (300 e 625 mg/kg/dia), a maior birrefringência avermelhada no grupo que recebeu a maior dose.

Desorganização das fibras colágenas pode levar a uma matriz óssea menos resistentes a fraturas (Mansell & Bailey, 2003; Silva, 2011) e dessa forma, acreditamos que o tratamento com SrR e SrR+VBM contribuiu para a formação de uma matriz óssea mais resistente a fraturas.

Interpretações morfológicas envolvendo a remodelação do colágeno devem ser analisadas com certo cuidado, pois a produção ou degradação destas proteínas ocorrem com frequência durante o desenvolvimento e processos de reparo (Montes, 1996). Apesar dos achados inéditos deste trabalho, acreditamos que uma análise bioquímica mais apurada deveria ser realizada para evidenciar discretas alterações nas fibras colágenas dos grupos estudados.

Os resultados obtidos com a técnica de TRAP mostraram o grande número de osteoclastos no grupo submetido ao tratamento com SrR+VBM na região trabecular em relação aos outros grupos. No entanto, ao consideramos o número de osteoclastos proporcionalmente a área óssea trabecular (volume ósseo) de cada grupo, verificamos que o tratamento com SrR foi mais eficaz nessa região, diminuindo em 19% o número de osteoclastos em relação ao Controle. Já os grupos SrR+VBM e VBM apresentaram maior percentual de osteoclastos que o Controle, respectivamente 33% e 43%. Quando comparamos somente os grupos tratados, notamos que tanto o grupo VBM quanto o SrR+VBM exibiram maior número de osteoclastos que o SrR, respectivamente 75% e 65%. Porém, o grupo combinado mostrou apenas 6% menos osteoclastos que o VBM.

Desta forma, podemos afirmar que o tratamento com SrR foi o mais efetivo na região trabecular, pois foi o único que levou a diminuição do número de osteoclastos em relação ao Controle. Esse resultado corrobora com os achados de densitometria óssea (DMO e CMO), testes biofísicos, biomecânicos e análises histomorfométricas no grupo que recebeu tratamento com SrR. Por outro lado, o grande número de osteoclastos presentes no grupo VBM também vai ao encontro do menor volume ósseo trabecular (BV/TV), diminuição da DMO, menor capacidade em

suportar cargas e menor rigidez neste grupo, sugerindo que um intenso processo de reabsorção óssea esteja ocorrendo.

Quando analisamos o osso cortical, não observamos diferenças entre os grupos, no entanto se considerarmos o número de osteoclastos proporcional a espessura da cortical (Ct.Wi) todos os tratamentos levaram a diminuição do número de osteoclastos nessa região, onde os grupos SrR, VBM e SrR+VBM apresentaram 31%, 29% e 37% menos osteoclastos que o Controle respectivamente.

Poucos trabalhos na literatura correlacionam o tratamento com SrR e VBM com a diminuição de osteoclastos. Campos (2013) observou o aumento de osteoclastos em ratas maduras osteopênicas tratadas com SrR (300 mg/kg/dia), e a diminuição no número de osteoclastos no grupo que recebeu a 625 mg/kg/dia de SrR, tanto na região trabecular quanto cortical. Moura (2014) observou uma diminuição no número no osso cortical de camundongos fêmeas OVX após tratamento com VBM.

Em outro estudo que utilizou o SrR de forma isolada em doses mais baixas do que a utilizada neste experimento, mostrou que o tratamento aumentou a reabsorção óssea em um primeiro momento, entretanto, não é sabido o que pode acontecer quando o tratamento é realizado de forma prolongada (Fuchs et al., 2008; Ma et al., 2011). Não existem relatos na literatura que abordem a ação da terapia combinada (SrR+VBM) sobre o número de osteoclastos.

No osso os principais glicosaminoglicanos são o condroitim sulfato (CS), queratam sulfato (KS), dermatam sulfato (DM) e heparam sulfato (HS) (Candlish & Holt, 1971; Fedarko et al., 1990; Grzesik et al., 2002; Yamamoto et al., 2005; Campos, 2013), no entanto, após a extração e identificação dos GAGs foi possível identificar apenas o perfil eletroforético semelhante ao do condroitim sulfato, e este diminuiu em todos os grupos tratados em relação ao Controle. No entanto, não encontramos diferenças entre os grupos tratados. Estudos relatam que o processo de mineralização do osso envolve a diminuição dos glicosaminoglicanos sulfatados. O condroitim, queratam e o dermatam sulfato estão presentes no osteóide recém-formado, e posteriormente com o progresso da calcificação esses GAGs sulfatados são removidos (Kazama et al., 1992; Takagi et al., 1997; Nakamura et al., 2001). A diminuição dos GAGs nos grupos tratados nos sugere que um processo de mineralização esteja ocorrendo, dessa forma os GAGs precisam ser degradados para que o cálcio preso aos grupamentos sulfato seja liberado, para que em seguida esses grupamentos sejam desarranjados e o cálcio

liberado, para então ser concretizada a união entre o cálcio e fósforo originando assim o fosfato de cálcio, elemento principal no processo de mineralização da matriz (Irving, 1973; Chen & Boskey, 1985).

Diminuição nos níveis de condroitim em animais OVX tratados com SrR (300 e 625mg/kg/dia) também foi observada por Campos (2013), sugerindo um processo de mineralização. Pacheco-Costa (2010) ao submeter ratas OVX ao tratamento com hPTH (1-34) observaram diminuição do condroitim no grupo que recebeu a maior dose (5µg/kg/dia), indicando que o processo de mineralização estava ocorrendo nesse grupo.

Merli e colaboradores (2012) observaram os efeitos do laser de baixa intensidade no processo de remodelação óssea no fêmur de ratos machos *Wistar*, onde também foi observado a diminuição de condroitim sulfato no osso maduro após 14 dias de tratamento.

Outro glicosaminoglicano, porém não sulfatado que está presente no tecido ósseo é o ácido hialurônico, e esse desempenha importante papel na formação, reabsorção e mineralização óssea (Prince, 2004; Hirata et al., 2009; Campos, 2013). Após a quantificação do ácido hialurônico pelo método de Elisa foi observado o aumento desse GAG no grupo VBM e a diminuição no SrR+VBM em relação a todos os outros grupos. É sabido que o AH de baixo peso molecular desempenha funções variadas como promover o aumento da osteoclastogênese, bem como manter os osteoclastos ligados a matriz através do receptor CD44. Assim quando em maior quantidade aumenta o número de osteoclastos formados e em atividade, consequentemente aumentando a taxa de reabsorção óssea (Rodan & Martin, 1981; Aruffo et al., 1990; Fujii et al., 2003; Ariyoshi et al., 2005). Já o AH de alto peso molecular desempenha função contrária ao de baixo peso, inibindo a diferenciação de progenitores de osteoclastos por meio do receptor CD44, sobretudo pelo receptor Toll-like 4 (TLR4) (Chang et al., 2007). Pode também atuar na formação óssea proporcionando o aumento do número de osteoblastos, promovendo a diminuição da reabsorção e o aumento da formação óssea (Sasak & Watanabe, 1995).

Acreditamos que o ácido hialurônico encontrado no grupo VBM seja o de baixo peso molecular, pois quando correlacionamos nossos achados com os resultados obtidos pelo TRAP e outras técnicas já discutidas nesse trabalho reforçam a ideia de que nesse grupo esteja ocorrendo um intenso processo de reabsorção óssea. Esses

dados de AH são inéditos e necessitam de maiores investigações, por isso uma análise bioquímica para peso molecular é necessária.

Os resultados obtidos após o término de todas as análises mostraram que o tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração de baixa intensidade e frequência a curto prazo (3 meses) exerceu efeito positivo em alguns parâmetros analisados: espessura/comprimento das tíbias, densidade mineral e material orgânico das vértebras, reorganização das fibras colágenas, glicosaminoglicanos da matriz óssea e espessura do osso cortical. Ressaltamos, no entanto, que os resultados obtidos referentes à ação do tratamento com SrR de forma isolada nos constituintes do tecido ósseo mostraram-se bastante satisfatórios, principalmente por elevar a densidade mineral óssea/conteúdo mineral ósseo, a rigidez e melhorar a microarquitetura óssea (BV/TV). Além disso, o tratamento com SrR de forma isolada também culminou no aumento do percentual de material orgânico, densidade mineral, capacidade em suportar cargas e na espessura dos fêmures e do osso cortical.

Levando-se em conta o que foi observado e com base em nossos achados de densitometria óssea, parece que o tratamento com vibração mecânica levou a um atraso no processo de mineralização, visto que os dados histomorfométricos não demonstraram diferenças em relação à área óssea trabecular e a espessura do osso cortical entre os grupos ranelato de estrôncio, e quando o mesmo é associado à vibração mecânica. Além disso, a rigidez óssea no grupo que recebeu tratamento com ranelato de estrôncio, talvez esteja relacionado a um processo de mineralização mais adiantado.

É amplamente aceito que atividades físicas proporcionam aumento na massa e na resistência óssea com maior eficácia em crianças do que em adultos e, além disso, quando se considera a estrutura óssea de indivíduos mais velhos a atividade física tem se mostrado menos eficaz (Forwood, Burr, 1993; Bassey et al., 1998). Esse decréscimo de eficácia é atribuído à redução da sensibilidade do tecido ósseo a estímulos mecânicos com o aumento da idade (Rubin et al., 1992; Turner et al., 1995). Embora essas observações tenham sido feitas em humanos, os resultados observados em nosso estudo no que diz respeito aos efeitos do tratamento com vibração mecânica isolada e associada ao ranelato de estrôncio, podem ser devido ao nosso modelo experimental ser considerado ratos fêmeas velhos (maduros).

Desta forma, no modelo experimental por nós utilizado neste estudo (ratas ooforectomizadas e osteopênicas tratadas por 3 meses), tanto o tratamento com ranelato de estrôncio associado a vibração mecânica de baixa intensidade e frequência bem como o ranelato de estrôncio administrado de forma isolada melhoram a microarquitetura e a qualidade óssea.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que o tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência por um período de 3 meses:

- ✓ Ampliou o comprimento e espessura das tíbias;
- ✓ Elevou a densidade mineral, o percentual de material orgânico, à capacidade em suportar cargas e tenacidade nas vértebras;
- ✓ Aumentou a espessura do osso cortical no fêmur;
- ✓ Acelerou o turnover ósseo;
- ✓ Teve ação na reorganização das fibras colágenas e nos glicosaminoglicanos da matriz óssea;
- ✓ Elevou o número de osteoclastos no fêmur distal.

O tratamento com ranelato de estrôncio na dose de 625mg associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência a curto prazo (90 dias) exerceu ação positiva nos constituintes do tecido ósseo em ratas osteopênicas. No entanto, o tratamento isolado com ranelato de estrôncio na dose de 625mg também foi eficaz em alguns parâmetros analisados neste trabalho, principalmente elevando a densidade e o conteúdo mineral ósseo dos animais submetidos a esse tratamento. O grupo que recebeu o tratamento isolado (SrR) também apresentou a maior capacidade de suportar cargas, maior tenacidade e a maior rigidez nas tíbias; e nos fêmures o maior volume ósseo. Desta forma, nossos resultados apontam que tanto o tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica bem como o ranelato administrado de forma isolada melhoram os parâmetros da microarquitetura e a qualidade óssea em ratas osteopênicas.

ANEXOS

6. ANEXOS



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 9 de setembro de 2011
CEP Nº: 1095/11

Ilmo(a) Sr(a

Pesquisador(a): MARIANA FREITAS DE JESUS

Disciplina/Departamento: Histologia e Biologia Estrutural/Morfologia

Pesquisadores associados: Marise Lazaretti Castro, Manuel de Jesus Simões (orientadora), Rejane Daniele Reginato

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Efeitos do ranelato de estrôncio associado a vibração mecânica de baixa intensidade no tecido ósseo de ratas osteopênicas :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Caracterizar as alterações do tecido ósseo de ratas osteopênicas, submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e alta frequência.

RESUMO: Estudo com 40 ratos Wistar, fêmeas, com 6 meses. As ratas serão ooforectomizadas e após três meses divididas em 4 grupos: GI (controle) – tratados com solução veicular; GII – tratados com ranelato de estrôncio na dose de 625 mg/kg/dia, por gavagem 7 dias por semana; GIII – tratados com ranelato de estrôncio na dose de 625 mg/kg/dia por gavagem + vibração mecânica por 20 min a 60Hz/0,5g/dia, 5 dias por semana e GIV – tratados apenas com vibração mecânica por 20 min a 60Hz/0,5g/dia, 5 dias por semana. Os animais serão submetidos à densitometria óssea antes e depois do tratamento e pesados semanalmente. Após 90 dias de tratamento, serão eutanasiados e os fêmures e tíbias dissecados e mensurados (espessura e comprimento). As tíbias serão congeladas e destinadas a análise das propriedades físicas (teste de flexão de 3 pontos) e biomecânicas (análise da % de água no osso, material, conteúdo, densidade e volume mineral ósseo). Os fêmures distais serão fixados em formaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M pH 7,2; descalcificados em EDTA, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes com 5µm de espessura serão evidenciados pela Hematoxilina e Eosina (HE) e submetidos à análise histomorfométrica para verificar o volume ósseo trabecular e espessura do osso cortical. Outros serão submetidos ao método histoquímico de Alcian Blue (AB) em pH 2,5 e pH 0,5, para quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados e outros destinados ao Picro-Sirius red para quantificar fibras colágenas. Alguns fragmentos dos fêmures distais serão mantidos em PBS, descalcificados em EDTA e processados para as análises biomoleculares de extração, identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A osteoporose é uma doença caracterizada pela perda de massa óssea e aumento no risco de fraturas. Estudos em animais demonstraram que o ranelato de estrôncio, previne a perda de massa óssea em animais osteopênicos. Outro tratamento, porém não farmacológico que também tem ação positiva no tecido ósseo é a vibração mecânica. O objetivo deste estudo é investigar os efeitos do ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica no tecido ósseo de ratas osteopênicas.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 2633,00

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 3/9/2012 e 29/8/2013

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Ahmet-Camcioglu N, Okman-Kilic T, Durmus-Altun G, Ekuklu G, Kucuk M. Effects of strontium ranelate, raloxifene and misoprostol on bone mineral density in ovariectomized rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 147 (2): 192-4.

Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone.* 2006; 38: 749-57.

Amadei, Susana Ungaro, Silveira, Vanessa Avila Sarmiento; Pereira, Andresa Costa; Carvalho, Yasmin Rodarte; Rocha, Rosilene Fernandes da. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42 (1): 5-12.

Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res.* 2004; 19 (20): 12–20.

Ammann P, Badoud I, Barraud S, Dayer R, Rizzoli R. Strontium Ranelate Treatment Improves Trabecular and Cortical Intrinsic Bone Tissue Quality, a Determinant of Bone Strength. *J Bone Miner Res.* 2007; 22 (9): 1419- 25.

Andia, Denise Carleto; Cerri, Paulo Sérgio; Spolidorio, Luiz Carlos. Bone tissue: morphological and histophysiolocal aspects. *Ver. Odontol. UNESP:* 2006; 35 (2): 191-198.

Arlot ME, Braillon P, Roux JP, Deloffre P, Tsouderos Y, Meunier PJ. A new agent containing strontium (S12911) has a protective effect on bone loss in ovariectomized rats. (abstract). *Bone.* 1992; 13: A1.

Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, Ichimiya H, Takano H, Koseki T, et al. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18967-72.

Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 202: 1261–1269.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990; 61: 1303-13.

Atkins GJ, Weldon KJ, Halbout P, et al. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblast promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int*. 2009; 20 (40): 653-64.

Bacabac Rg, Smit Th, Mullender Mg, Dijcks Sj, Van Loon Jjwa, Klein-Nulend J. Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 315: 823–9.

Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int*. 2009; 20 (8): 1417–28.

Barbara A, Delannoy P, Denis BG, Marie PJ. Normal Matrix Mineralization Induced by Strontium Ranelate in MC3T3-E1 Osteogenic Cells. *Metabolism*. 2004; 53 (4): 532-537.

Bassey EJ, Bothwell MC, Littlewood JJ, Pye DW. Pre and postmenopausal women have different bone mineral density response to the same high-impact exercises. *J Bone Miner Res*. 1998; 13: 1805-1813.

Bastow, E. R., S. Byers, S. B. Golub, C. E. Clarkin, A. A. Pitsillides and A. J. Fosang Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell. Mol. Life Sci*. 2008; 65: 395–413.

Bautmans I, Van Hees E, Lemper JC, et al. The feasibility of Whole Body Vibration in institutionalized elderly persons and its influence on muscle performance, balance and mobility: a randomized controlled trial [ISRCTN62535013].

Bedani R, Rossi EA, Lepera JS, Wang CC, Valdez GF. Efeito de um novo produto fermentado de soja, enriquecido com isoflavonas e cálcio, sobre o tecido ósseo de ratas. Arch Latinoam Nutr. 2006; 56 (2): 146-152.

Beck BR, Kent K, Holloway L, Marcus R. Novel, high-frequency, low-strain mechanical loading for premenopausal women with low bone mass: early findings. J Bone Miner Metab. 2006; 24 (6): 505-7.

Bennell K, Khan K, McKay H. The role of physiotherapy in the prevention and treatment of osteoporosis. Man Ther. 2000; 5 (4): 198-213.

Bentolila V, Boyce TM, Fyhrie DP, et al. Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. Bone. 1998; 23 (3): 275–81.

Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Tsouderos Y, et al. Strontium distribution and interactions with the bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S12911) administration. J Bone Miner Res. 1996; 11: 1302–131.

Boivin G, Farlay D, Khebbab MT, Jaurand X, Delmas PD, Meunier PJ. In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization. Osteoporos Int. 2010; 21: 667–677.

Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT. Cutting Edge: High Molecular Weight Hyaluronan Promotes the Suppressive Effects of CD4_CD25_Regulatory T Cells. The Journal of Immunology. 2007; 179: 744–747.

Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. Br J Pharmacol. 2009; 157 (7): 1291–1300.

Breitman PL, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone*. 2003; 33: 597-605.

Brendan, F, Boyce, Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *ArthritisResearch & Therapy*. 2007; 9 (1): 1-7.

Brixen KT, Christensen PM, Ejersted C, et al. Teriparatide (biosynthetic human parathyroid hormone 1-34): a new paradigm in the treatment of osteoporosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004; 94 (6): 260-70.

Brouwers JE, van Rietbergen B, Ito K, Huiskes R. Effects of vibration treatment on tibial bone of ovariectomized rats analyzed by in vivo micro-CT. *J Orthop Res*. 2010; 28 (1): 62-9.

Brown TJ, Laurent UB, Fraser JR. Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labeled hyaluronan from the knee joint of the rabbit. *Exp. Physiol*. 1991; 76: 125–134.

Bruyere O, Wuidart MA, Di Palma E, et al. Controlled whole body vibration to decrease fall risk and improve health-related quality of life of nursing home residents. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005; 86 (2): 303-7.

Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell*. 2001; 23: 318-25.

Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008; 42 (1): 129–138.

Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116: 281-90.

Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008; 42 (4): 606-15. Bonewald L. Osteocytes. In: Marcus R, editor. *Osteoporosis*, 3 Elsevier; 2008; 170–89.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011; 26 (2): 229-38.

Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest*. 2012 Dec; 42 (12): 1332-41.

Boyd SK, Szabo E, Ammann P. Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. *Bone*. 2011; 1:48 (5): 1109-16.

Breitman PL, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone*. 2003; 33: 597-605.

Bruyere, O., Roux, C., Badurski, J., et al.. Relationship between change in femoral neck bone mineral density and hip fracture incidence during treatment with strontium ranelate. *Curr Med Res Opin*. 2007; 23: 3041–3045.

Buehler J, Chappuis P, Saffar JL, et al. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*. 2001; 29: 176-9.

Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, et al. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res*. 1997; 12 (1): 6–15.

Camargo MBR, Cendoroglo MS, Ramos LR, Latorre MRDO, Saraiva GL, Lage A, et al. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly caucasian elderly population in the city of São Paulo, Brazil. *Osteoporos Int*. 2005; 16 (11): 1451-60.

Campos, J.F. Influência do ranelato de estrôncio em diferentes doses no tecido ósseo de ratas osteopênicas. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2013.

Canalis E, Hott M, Deloffre P, et al. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*. 1996; 18 (6): 517-23.

Candlish JK; Holt FJ. The proteoglycans of fowl cortical and medullary bone. *Comp Biochem Physiol*. 1971; 40B: 283-93.

Cardinale M, Leiper J, Farajian P, et al. Whole-body vibration can reduce calciuria induced by high protein intakes and may counteract bone resorption: A preliminary study. *J Sports Sci*. 2007; 1; 25 (1): 111-9.

Caudrillier A, Hurtel-Lemaire AS, Wattel A, Cournarie F.; Godin C, Petit L, et al. Strontium Ranelate Decreases Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand-Induced Osteoclastic Differentiation In Vitro: Involvement of the Calcium-Sensing Receptor. *Mol Pharmacol*. 2010; 78 (4): 569–576.

Chang EJ, Kim HJ, Ha J, Ryu J, Park KH, Kim UH, et al. Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4. *J Cell Sci*. 2007; 120: 166-76.

Chen C-C and Boskey A L. Mechanisms of proteoglycans inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif. Tiss. Int*. 1985. 37 (4): 395–400.

Choudhary S, Halbout P, Alander C, Raisz L, Pilbeam C. Strontium Ranelate Promotes Osteoblastic Differentiation and Mineralization of Murine Bone Marrow Stromal Cells: Involvement of Prostaglandins. *J Bone Miner Res*. 2007; 22 (7): 1002-10.

Chow DH, Leung KS, Qin L, Leung AH, Cheung WH. Low-Magnitude High-Frequency Vibration (LMHFV) Enhances Bone Remodeling in Osteoporotic Rat Femoral Fracture Healing. *J Orthop Res*. 2011; 29 (5): 746-52.

Cianferotti L, D'Asta F, Brandi ML. A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013; 5 (3): 127-39.

Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin O, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol*. 2007; 26: 380-4.

Corsi A, Xu T, Chen XD, Boude A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissue. *J Bone Miner Res*. 2002; 17 (7): 1180-9.

Christiansen BA, Silva MJ. The Effect of Varying Magnitudes of Whole-Body Vibration on Several Skeletal Sites in Mice. *Annals of Biomedical Engineering*. 2006; 34 (7): 1149–56.

Dahl SG, Allain P, Marie PJ, et al. Strontium Distribution and Interactions with Bone Mineral in Monkey Iliac Bone after Strontium Salt (S 12911) Administration. *Bone*. 2001; 28 (4): 446–453.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. *J J Clin Pathol*. 2008; 61: 577-87.

Deed, R., P. Rooney, P. Kumar, J. D. Norton, J. Smith, A. J. Freemont, and S. Kumar. Early-response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int. J. Cancer*. 1997; 71: 251–256.

Delannoy P, Bazot D, Marie PJ. Long-Term Treatment with Strontium Ranelate Increases Vertebral Bone Mass without Deleterious Effect in Mice. *Metabolism*. 2002; 51 (7): 906-911.

Dempster DW, Cosman ES, Kurland ES, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: A paired biopsy study. *J Bone Miner Res.* 2001; 16 (10): 1846-53.

Derry C, Derry S, Moore RA, McQuay H. Single dose oral ibuprofen for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 8 (3): CD007588.

Deyhim F, Stoecker BJ, Brusewitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutr Res.* 2003; 23: 123-130.

D'Haese PC, Schrooten I, Goodman WG, et al. Increased bone strontium levels in hemodialysis patients with osteomalacia. *Kidney Int.* 2000; 57 (3): 1107-1114.

Doublier A, Farlay D, Jaurand X, Vera R, Boivin G. Effects of strontium on the quality of bone apatite crystals: a paired biopsy study in postmenopausal osteoporotic women. *Osteoporos Int.* 2012; 12:81-89.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *science.* 2000; 289 (5484): 1501-1504.

Emerton KB , Hu B , Woo AA , Sinofsky A , Hernandez C , Majeska RJ , Jepsen KJ , Schaffler MB . Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone.* 2010; 46 (3): 577-83.

Ensina LF, Fernandes FR, Gesu GD, Malaman MF, Chavarria ML, Bernd LAG. Reações de Hipersensibilidade a Medicamentos – Parte III. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2009; 32 (5): 178-183.

Faloni APS. Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Faloni APS. Biologia de osteoclastos: estudo in vivo da ação do estrógeno sobre osteoclastos e estudo in vitro da osteoclastogênese a partir de precursores de sítios ósseos distintos. [Tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010.

Fedarko NS, Termine JD, Young MF, Robey PG. Temporal regulation of hyaluronan and proteoglycan metabolism by human bone cells in vitro. *J Biol Chem.* 1990; 265 (21): 12200-9.

Feng X, Mc Donald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 121-45.

Fisher M. The ischemic penumbra: identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 17 Suppl 1:1–6.

Flieger J, Karachalios TH, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G. Mechanical Stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63 (6): 510-14.

Florêncio Silva-R, Santos MA, VP de Medeiros, et al. Effects of soy Climacteric. 2013; 16 (6): 709-17.

Forwood MR, Burr DB. Physical activity and bone mass: exercise in futility? *Bone Miner.* 1993; 21: 89-112.

Forwood MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (11): 1688-93.

Forwood MR, Li L, Kelly WL, Bennett MB. Growth hormone is permissive for skeletal adaptation to mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 2001.16: 2284-2290.

Fraser, J. R., T. C. Laurent and U. B. Laurent Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 1997 ; 242, 27–33.

Fritton S, Rubin C. In vivo measurement of bone deformation using strain. Gauges. In: CowenS, editor. *Bone Mechanics handbook*. 2nd edition. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2001. p. 1–41.

Fromigué O, Hay E, Barbara A, Marie PJ. Essential Role of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-mediated Wnt Signaling in Osteoblast Differentiation Induced by Strontium Ranelate. *J Biol Chem*. 2010; 285 (33): 25251–25258.

Fuchs RK, Allen MR, Condon KW, Reinwald S, Miller LM, McClenathan D, Keck B, Phipps RJ, Burr DB. Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2008; 19: 1331–1341.

Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y. Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Letters*. 2003; 539: 45-50.

Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20 (5): 230-6.

Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, et al. Increased bone mass in mice after single injection of anti-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-neutralizing antibody: evidence for bone anabolic effect of parathyroid hormone in mice with few osteoclasts. *J Biol Chem*. 2011; 286 (42): 37023-31.

Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas*. 2008; 60: 65-69.

Gartner L.P. & Hiatt J.L. *Tratado de histologia*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Geoffroy V, Chappard D, Marty C, Libouban H, Ostertag A, Lalande A, et al. Strontium ranelate decreases the incidence of new caudal vertebral fractures in a growing mouse model with spontaneous fractures by improving bone microarchitecture. *Osteoporos Int*. 2011; 22 (1): 289-97.

Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Mongiorgi R, Gnudi S, Zati A. Experimental surgical model in osteoporosis study. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1993; 69 (7-8): 453-60.

Grosso A, Douglas I, Hingorani A, MacAllister R, Smeeth L. Post-marketing assessment of the safety of strontium ranelate; a novel case-only approach to the early detection of adverse drug. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66 (5): 689-93.

Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG, Fedarko NS. Age-related changes in human bone proteoglycan structure. Impact of osteogenesis imperfect. *J Biol Chem*. 2002; 277 (46): 43638-47.

Gundberg, C.M. Matrix proteins. *Osteoporos Int*. 2003, 14 (5): 37–42.

Gusi N, Raimundo A, Leal A. Low-frequency vibratory exercise reduces the risk of bone fracture more than walking: a randomized controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2006; 7: 92-100.

Habermann B, Kafchitsas K, Olender G, Augat P, Kurth A. Strontium Ranelate Enhances Callus Strength More Than PTH 1-34 in an Osteoporotic Rat Model of Fracture Healing. *Calcif Tissue Int*. 2010; 86:82–9.

Hamdy NAT. Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. *Rheumatology*. 2009. 48: 9-13.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423: 349-355.

Hass CT, Turbanski S, Kessler K, Schmidbleicher D: The effects of random whole-body-vibration on motor symptoms in Parkinson's disease. *NeuroRehabilitation* 2006; 21: 29-36.

Hens JR, Wilson KM, Dann P. et al. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res*. 2005; 20 (7): 1103-13.

Hirata M, Kobayashi M, Takita M, Matsumoto C, Miyaura C, Inada M. Hyaluronan inhibits bone resorption by suppressing prostaglandin E synthesis in osteoblasts treated with interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 381: 139-43.

Hirshberg A, Lib M, Kozlovsky A, Kaplan I. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*. 2007; 43 (1): 278-82.

Hock JM, Canalis E, Centrella M. Transforming growth factor-beta stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology*. 1990; 126: 421– 26.

Horton, M. R., S. Shapiro, C. Bao, C. J. Lowenstein, and P. W. Noble. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J. Immunol*. 1999; 162: 4171– 6.

Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. *Bone*. 2003; 115–23.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996; 2 (10): 1132–1136.

Hughes SW. Archimedes revisited: a faster, better, cheaper method of accurately measuring the volume of small objects. *Phys Educ*. 2005; 40: 468-74.

Hurtel-Lemaire AS, Mentaverri R, Caudrillier A, Cournarie F, Wattel A, Kamel S et al. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem*. 2009; 284 (1): 575–584.

Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials*. 2005; 26 (3): 311-8.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Base de Dados na Internet]. Brasil: IBGE (BR); 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estati.shtm#sub_populacao. Arquivos atualizados anualmente.

Irving JT. Theories of mineralization of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1973; 97: 225-36.

Ishimi Y, Mizacura C, Homer M, Onoe Y, Sato T, Ushiyama Y, Ito M, Wang XX, Suda T, Ikegami S: Selective effects of genistein, a soy isoflavone on B-Lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 1999; 40: 1893-1900.

Jankovich JP. The effects of mechanical vibration on bone development in the rat. *J Biomech*. 1972. 5 (3): 241-50.

Jayakumar P. & Silvio LD. Osteoblast in bone tissue engineering. *J. Engineering in Medicine*. 2011; 224 (12): 1415-1440.

Jee WS, Tian XY. The benefit of combining non-mechanical agents with mechanical loading: a perspective based on the Utah Paradigm of Skeletal Physiology. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*. 2005; 5 (2): 110-8.

Jeffcoat M. The association between osteoporosis and oral bone loss. *J Periodontol*. 2005; 76:2125-32.

Jilka RL. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1999; 104: 439-46.

Johnson AR, Armstrong WD, Singer L. The incorporation and removal of large amounts of strontium by physiologic mechanisms in mineralized tissues. *Calcif Tissue Res.* 1968; 2: 242–252.

Johnson LC. Histogenesis and mechanism development of osteofluorosis. In: Simmons JH (ed) *Fluorine Chemistry, IV.* Academic Press, New York. 1965; 424-444.

Johnston CC, Smith DM, Severson AR: Bone resorption and matrix hexosamine labeling. *Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins* Edited by: Talmage RV, Munson PL. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation. 1972:327-337.

Judex S, Lei X, Han D, Rubin C. Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. *J Biomech.* 2007; 40 (6): 1333-9.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. Tecido ósseo, Cap. VIII. In: *Histologia básica.* 11ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro-RJ. 2008; 135-152.

Kalu DN. The ovariectomized rat mode of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral.* 1991; 15 (3): 175-92.

Katchburian E, Arana VE. *Histologia e Embriologia Oral.* 2a ed. Rio de Janeiro: 2004; Guanabara Koogan.

Katchburian E, Cerri PS. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. *Odontologia.* São Paulo: Artes Médicas (Divisão Odontológica). 2002; 43: 7-45.

Kazama T, Takagi M, Ishii T, Toda Y. Immunoelectron microscopic studies of glycosaminoglycans in the metaphyseal bone trabeculae of growing bone rats. *Histochemical J.* 1992; 24: 747-755.

Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-

osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone*. 2012; 50 (5): 1115–1122.

Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Rev Bras Reumatol*. 2011; 51 (4): 365-71, 379-82.

Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: Theory and practice*. 4th edition. Oxfordshire: Scion Publishing Limited; 2008; 606p.

Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à patologia*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: 2004; Elsevier; 106-108.

Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Kim K, Lee SH, Kim JH, Choy Y, Kim N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up regulation of osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med*. 2006. 12 (12): 1403-1409.

Kim Y, Om AS. Soy isoflavones in ovariectomized growing rats as bone disease prevention. In *International Symposium on Food, Nutrition, and Health for 21st Century*, Seoul, Korea. The Kor Soc of Food Sci Nutr. 2001; SIII-21:120- 125. -25.

Klein-Nulend, J., Plas V.D.A., Semeins, C.M., Ajubi N.E., Frangos, J.A., Nijweide, P.J., Burger, E.H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J*. 1995; 9: 441–5.

Krane SM. Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. *J Exp Med*. 2005; 201: 841-843.

Kribbs PJ, Smith DE, Chesnut CH. Oral findings in osteoporosis. Part II: relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. *J Prosthet Dent*. 1983; 50: 719-24.

Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012; 45 (12): 863-73.

Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Rédini F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *BioEssays*. 2007; 29: 758–771.

Leaffer D, Sweeney M, Kellerman LA, Avnur Z, Krstenansky JL, Vickery BH, et al. Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related peptide-(1-34), and bovine PTH-(1-34). *Endocrinology*. 1995; 136 (8): 3624-31.

Likins, R. C., Posner, A. S., Kunde, M. L, and Craven, D. L. Comparative metabolism of calcium and strontium in the rat. *Arch Biochem Biophys*. 1959; 83: 472–481.

Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH & Hu J. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2010; 21 (11): 1889-97.

Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; Oct 13; 349 (1): 1-5.

Lirani-Galvão AP, Lazaretti-Castro M, Portero-Muzy N, Bergamaschi CT, Silva OL, Carvalho AB, et al. Nitric Oxide a Mediator of the Effects of Low-Intensity Electrical Stimulation on Bone in Ovariectomized Rats? *Calcif Tissue Int*. 2010; 87 (1): 52-59.

Luben RA, Goggins JF, Raisz LG: Stimulation by parathyroid hormone of bone hyaluronate synthesis in organ culture. *Endocrinology*. 1974; 94: 737-745.

Ma YL, Zeng QQ , Porras LL , Harvey A , Moore TL , Shelbourn TL , et.al. Teriparatide [rhPTH (1-34)], but not strontium ranelate, demonstrated bone anabolic efficacy in mature, osteopenic, ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2011; 152 (5): 1767-78.

MacDonald NS, Nusbaum RE, Stearns R, Ezmirlian F, McArthur C, Spain P. The skeletal deposition of non-radioactive strontium. *J Biol Chem*. 1951; 188: 137–143.

Maimoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*. 2010; 46 (5): 1436-41.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000; 21: 115-37.

Mansell JP, Bailey AJ. Increased metabolism of bone collagen in post-menopausal female osteoporotic femoral heads. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35 (4): 522-9.

Marie, PJ, Garba MT, Hott M, Miravet L. Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats. *Miner Electrolyte Metab*. 1985; 11 (1): 5-13.

Marie PJ, Hott M. Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse. *Metabolism*. 1986; 35 (6): 547-551.

Marie, P. J. Preventive effects of S12911 on immobilisation induced bone loss. IRIS Report PHA-12911-040-FRA; 1991.

Marie PJ, Hott M, Modrowski M, Pollak C, Guillemain, J, Deloffre, P, Tsouderos, Y. An Uncoupling Agent Containing Strontium Prevents Bone Loss by Depressing Bone Resorption and Maintaining Bone Formation in Estrogen-Deficient Rats. *J. Bone Miner. Res*. 1993; 8 (5): 607-615.

Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone. *Calcif Tissue Int*. 2001; 69: 121–129.

Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 7–10.

Marie PJ. Strontium Ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone.* 2006; 38 (2 Suppl 1): S10-4.

Marie PJ. Effective doses for strontium ranelate. *Osteoporos Int.* 2008; 19 (12): 1813.

Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2011; 22 (6): 1659-67.

Mark S, Link H. Reducing osteoporosis: prevention during childhood and adolescence. *Bull World Health Organ.* 1999; 77 (5): 424-6.

Martin RB. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. *J Biomech.* 1990; 23 (10): 1021-9.

Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. *Skeletal tissue mechanics.* New York: Springer-Verlag; 1998.

Martin TJ. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World J Orthop.* 2013; 4 (4): 186-197.

Martins JRM, Passerotti CC, Maciel RMB, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan y a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem.* 2003; 319: 65-72.

Mazzuoli, G, Samachson J, Laszlo D. Interrelationship between serum calcium levels: Calcium⁴⁵ and strontium 85 metabolism in man. *J Lab Clin Med.* 1958; 52: 522–332.

Mellis DJ, Itzstein C, Helfrich MH, et al. The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *J Endocrinol*. 2011; 211 (2): 131-43.

Merli LAS, Medeiros VP, Reginato RD, Katchburian E, Nader HB, Faloppa F. The Low Level Laser Therapy Effect on the Remodeling of Bone Extracellular Matrix. *Photochemistry and Photobiology*. 2012; 88: 1293–1301.

Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD, Sebert JL, Brandi ML, Albanese C, *et al*. Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis — a 2-year randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 2060–2066.

Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med*. 2004. 350 (5): 459-468.

Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, Diaz-Curiel M, Compston J, Marquis P, Cormier C, et al. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2009; 20 (10): 1663–1673.

Miao D, Scutt A. Recruitment augmentation apoptosis of rat osteoclasts in 1,25 (OH)₂D₃ response to short-term treatment with 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in vivo. *BMC Musculoskeletal Disord* [serial online] 2002. June [cited 2007 Feb 1]; 3:16 [10 screens]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/3/16>.

Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate resistant. *Calcif Tissue Int*. 1982; 34 (3): 285-90.

Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*. 1999; 17 (1): 57-60.

Montes GS, Krisztan RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PAS, Junqueira LCU. Histochemical and morphology characterization of reticular fibers. *Histochemistry*. 1980; 65: 131-141.

Montes GS & Junqueira LCU. The use of Picrosirius-Polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1991; 86 (3): 1-11.

Montes GS. Structural Biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International*. 1996; 20 (1): 15-27.

Moura, MLA. Efeitos da vibração mecânica de baixa intensidade e frequência associada ao tratamento com estrógeno no tecido ósseo de camundongos osteopênicos fêmeas. [tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2014.

Nakamura H, Hirata A, Tsuji T, Yamamoto T. Imuno localization of keratan sulfate proteoglycan in rat calvaria. *Arch. Histol. Cytol*. 2001; 64: 109-118.

Nakamura I, Roda GA, Duong le T. Regulatory mechanism of osteoclast activation. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2003; 52 (6): 527-33.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, *JAMA* 285 (2001) 785–795.

Nikitovic D, Zafiropoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK, Tsatsakis AM. Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res*. 2005; 25: 2851–2856.

Noble, P. W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol*. 2002; 21: 25–29.

Noble BS. The osteocyte lineage. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2008; 473: 106–1.

Nordsletten L, Kaastad TS, Madsen JE, Reikeras O, Ovstebo R, Stromme JH, Falch J. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. Calcif Tissue Int. 1994; 55: (6): 136-442.

Oleksik AM, Ewing S, Shen W, van Schoor NM, Lips P. Impact of incident vertebral fractures on health related quality of life (HRQOL) in postmenopausal women with prevalent vertebral fractures. Osteoporos Int. 2005. 16 (8): 861-70.

Oliveira ML, Bergamaschi CT, Silva OL, Nonaka KO, Wang CC, Carvalho AB, et al. Mechanical vibration preserves bone structure in rats treated with glucocorticoids. Bone. 2010; 46 (6): 1516-21.

Organização Mundial da saúde [Base de Dados na Internet]. Brasil: OMS (BR); 2006. Disponível em: <http://www.who.int/countries/bra/es/>.

Oscarino, Natália de Melo, Serakides Rogéria. Effect of the physical activity on normal bone and on the osteoporosis prevention and treatment. Rev. bras. med. esporte. 2006; 12 (3):164-168.

Oxlund BS, Ortoft G, Andreassen TT, Oxlund H. Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. Bone. 2003; 32: 69–77.

Ozcivici E, Luu YK, Adler B, Qin YX, Rubin J, Judex S, Rubin CT. Mechanical signals as anabolic agents in bone. Nat Rev Rheumatol. 2010; 6 (1): 50-9.

Ozturan KE, Demir B, Yucel I, Cakici H, Yilmaz F, Haberal A. Effect of Strontium Ranelate on Fracture Healing in the Osteoporotic Rats. J Orthop Res. 2011; 29 (1): 138-42.

Pacheco-Costa, R. Ação do paratormônio humano (1-34) no tecido ósseo de ratas osteopênicas [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010.

Paik MK, Lee HO, Chung HS, Yang SO, Kim JH, Om AS. Genistein may prevent cadmium-induced bone loss in ovariectomized rats. J Med Food. 2003. 6 (4): 337-43.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. J Bone Miner Res. 1987; 2 (6): 595-610.

Pastor FAC. Efeitos do acetato de chumbo em tecido ósseo de ratos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos. 2009.

Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP, et al. Dose-dependent bone-sparing effects dietary isoflavones in the ovariectomized rat. Br J Nutr. 2001; 85: 307-316.

Pins, C.D., Christiansen, D.L., Patel, R. and Silver, F.H., Self-Assembly of Collagen Fibers. Influence of Fibrillar Alignment and Decorin on Mechanical Properties. Bio-phys. J. 1997; 73: 2164–2172.

Pope M, Mcleod K, Fritton JC, Magnusson M, Rostedt M, Hansson T, Rubin C. Transmission of whole body vibrations in the 10–40 Hz range into the hip and lumbar spine. Biomechanics 2003; 28: 2621–7.

Protos® 2g: Ranelato de estrôncio [bula de remédio]. Responsável técnico no Brasil: Patrícia Kasesky de Avelar. Gidy, França: Les laboratoires Servier Industrie; 2012.

Price, R.D.; Berry, M.G.; Navsaria H.A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2007; 60, 1110-1119.

Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. BMC Musculoskelet Disord.

2004. 29: 5-12.

Raisz LG, Rodan GA. Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. San Diego: Academic Press; 1998. p. 1-22.

Reginster JY, Seeman E, Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, et al. Strontium Ranelate Reduces the Risk of Nonvertebral Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) Study. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90 (5): 2816-2822.

Reginster, J., Bruyere, O, Collette, J. Strontium ranelate treatment increases osteoprotegerin serum levels in postmenopausal osteoporotic women. Bone. 2012; 50: 1201–1202; author reply 1203–1204.

Retamoso LB, Cunha TMA, Knop LAH, Shintcovsk RL, Tanaka OM. Organization and quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth movement. Micron. 2009; 40 (8): 827-30.

Riggs BL, Melton LJ. Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management. New York: Raven Press. 1998; 133-154.

Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. J Clin Invest. 2000; 106:1203-4.

Rittweger J. Can exercise prevent osteoporosis? J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006; 6 (2): 162-66.

Rizzoli R, Laroche M, Krieg MA, Frieling I, Thomas T, Delmas P, Felsenberg D. Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. Rheumatol Int. 2010; 30 (10): 1341-1348.

Rizzoli R, Reginster JY, Boonen S, Bréart G, Diez-Perez A, Felsenberg D, Kaufman JM, Kanis JA, Cooper C. Adverse Reactions and Drug–Drug Interactions in the Management of Women with Postmenopausal Osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2011; 89: 91-104.

Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworky PJ. et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006; 281 (42): 31720-8.

Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8: 1-44.

Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA. et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008; 283 (9): 5866-75.

Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* 2010; 21 (9): 1457-69.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981; 33: 349-51.

Ruan XY, Jin FY, Liu YL, Peng ZL, Sun YG. Effects of vibration therapy on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Chin Med J (Engl).* 2008; 5: 121 (13): 1155-8.

Rubin CT, Bain SD, McLeod KJ. Suppression of the osteogenic response in the aging skeleton. *Calcif Tissue Int.* 1992; 50: 306-313.

Rubin CT, Sommerfeldt DW, Judex S, Qin, Y. Inhibition of osteopenia by low magnitude, high-frequency mechanical stimuli. *Drug Discov Today* 2001; 6 (16): 848-858.

Rubin C, Turner AS, Muller R, Mittra E, Mcleod K, Lin W, Qin Y. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *Bone and Miner Res.* 2002; 17 (3): 349-57.

Rubin C, Turner A, Mcleod K, Bain SD, Jerome C, Mallinckrodt C. Mechanical strain induced non-invasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 2002; 30 (3): 445–52.

Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 343-51.

Rubin MR, Bilezikian JP. Parathyroid hormone as an anabolic skeletal therapy. *Drugs.* 2005; 65 (17): 2481-98.

Rubin C, Judex S, Qin YX. Low-level mechanical signals and their potential as a non pharmacological intervention for osteoporosis. *Age and Ageing.* 2006; 35 (2): 32- 6.

Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F, Colasante F, Villa I, Willnecker J, Moro GL, Spreafico LP, Ferretti M, Guidobono F, Marotti G. Ovariectomy sensitizes rat cortical bone to whole-body vibration. *Calcif Tissue Int.* 2008; 82 (4): 316-26.

Rutherford OM. Is there a role for exercise in the prevention of osteoporotic fracture? *Br J Sports Med.* 1999; 33: 378-386.

Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: molecular mechanism and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol Ther.* 2012; 136: (2): 216-26.

Salbach J, Kliemt S, Rauner M, Rachner TD, Goettsch C, Kalkhof S, von Bergen M, Möller S, Schnabelrauch M, Hintze V, Scharnweber D, Hofbauer LC. The effect of the degree of sulfation of glycosaminoglycans on osteoclast function and signaling pathways. *Biomaterials.* 2012; 33 (33): 8418-29.

Stepan JJ. Strontium ranelate: in search for the mechanism of action. *J Bone Miner Metab.* 2013; 31 (6): 606-12.

Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, et al. Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int.* 2009; 20 (12): 1999-2008.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *European Cells and Materials.* 2008; Vol.15: 53-76.

Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Sci.* 1941; 941-8.

Sinaki M. Exercise and osteoporosis. *Arch Phys Med Rehabil.* 1989; 70 (3): 220-9.

Silva RF. Efeitos das isoflavonas da soja associadas à vibração mecânica de baixa intensidade no tecido ósseo de ratas osteopênicas. [tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2011.

Silvestrini G, Mocetti P, Ballanti P, Di Grezia R, Bonucci E. In vivo incidence of apoptosis evaluated with the TdT FragELTM DNA fragmentation detection kit in cartilage and bone cells of the rat tibia. *Tissue Cell.* 1998; 30: 627-33.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol.* 2000; 24: 99-126.

Sodek J, Overall CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix Suppl.* 1992; 1: 352-62.

Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001; 10: 86–95.

Sowers M, Crutchfield M, Bandekar R, Randolph JF, Shapiro B, Schork MA, et al. Bone mineral density and its change in pre-and postmenopausal white women: the Michigan bone health study. *J Bone Miner Res.* 1998; 13 (7): 1134-40.

Spencer H, Laszlo D, Brothers M. Strontium 85 and calcium45 metabolism in man. *J Clin Invest.* 1957; 36: 680–688.

Stevens, A, Lowe, J.S. *Histologia humana*. 2^a ed. São Paulo: Manole LTDA, 2001, Pg. 234-247.

Suda, T., Nakamura, I., Jimi, E. and Takahashi, N. Regulation of osteoclast function. *J. Bone Miner. Res.* 1997; 12; 869–879.

Suda, T., Takahashi, N. Contributions to osteoclast biology from Japan. *Proc. Jpn. Acad.* 2008; 10: 84: 419-438.

Szendrői, M.; Vajta, G.; Kovács, L.; Schaff, Z.; Lapis, K. Polarization colours of collagen fibres: a sign of collagen production activity in fibrotic processes. *Acta morphol. Hung.* 1984; 32: 47-55.

Tabari Za, Azadmehr A, Tabrizi Ma, et al. Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in periodontal disease and health. *J Periodontal Implant Sci.* 2013; 43 (5): 227-32.

Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, et al. S12911-2 inhibits osteoclast bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 2003. 18 (6): 1082-7. *J Bone. Miner Res.* 2003; 18 (6): 1082-7.

Tan SD, Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone.* 2007; 41: 745–51.

Tang LY, Raab-Cullen DM, Yee JA, Jee WSS, Kimmel DB. Prostaglandin E2 increases the skeletal response to mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 1997; 12: 276-282.

Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 2007; 5 (6): 464-75.

Termeer CF, Benedix J, Sleeman C, Fieber U, Voith T, Ahrens K, Miyake M, Freudenberg CG, Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 99–111.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981; 26 (1 Pt 1): 99-105.

Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, Schmelz U, Kolios L, Rack T, Stuermer KM, Stuermer EK. Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rats as an osteopenia model. *Calcif Tissue Int.* 2011; 88 (1): 33-40.

Totosy de Zepetnek JO, Giangregorio LM, Craven BC. Whole-body vibration as potential intervention for people with low bone mineral density and osteoporosis: A review. *J Rehabil Res Dev.* 2009; 46 (4): 529-42.

Turner CH, Takano Y, Owan I. Aging changes mechanical loading thresholds for bone formation in rats. *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 1544-1549.

Tu X, Rhee Y, Condon KW, et al. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone.* 2012; 50 (1): 209-17.

van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004; 199 (6): 805-14.

Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 959-71.

Väänänen HK, Laitala-Leinonen Tiina. Osteoclast lineage and function. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2008. 473: 132–138.

Valério, P. Ortodontia e Ortopedia Funcional dos Maxilares e DTM. In: 7 simposio brasileiro e encontro internacional de dor. São Paulo. ABDR. 2005; v. 7. p. 317-319.

Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, et al. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? J Bone Miner Res. 2002; 17 (5): 907–14.

Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen Vanderschueren Dirk, Boonen S. Effect of 6-Month Whole Body Vibration Training on Hip Density, Muscle Strength, and Postural Control in Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Pilot. Study. J. Bone Miner Res. 2004; 19 (3): 352-59.

Vignery A. Macrophage fusion: The making of osteoclasts and giant cells. J Exp Med. 2005; 202 (3): 345-51.

Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. J Bone Miner Res. 2012; 27 (3): 499-505.

Zhang XS, Gao SS, Li QN, Hu B, Jin XJ. Mechanisms and Effects of Different Intensities Exercise on Bone Mass in Ovariectomized Rats. Chinese Journal of Sports Medicine. 2001; 20: 147-150.

Zhu LL, Zaidi S, Peng Y. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 6: 355 (2): 307-11.

Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, *et.al.* Syk, c-Src, the $\alpha\beta3$ integrin and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclast bone resorption. *J Cell Biol.* 2007; 176 (6): 877-88.

Wark JD. Osteoporosis: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 1999; 77 (5): 424-6.

Warden SJ, Galley MR, Hurd AL, Richard JS, George LA, Guildenbecher EA, Barker RG, Fuchs RK. Skeletal Benefits of Mechanical Loading are Maintained Long-Term in Mice Independent of Ovariectomy. *J Bone Miner Res.* 2013.

Washimi Y, Ito M, Morishima Y, Taguma K, Ojima Y, Uzawa T, *et al.* Effect of combined human PTH (1-34) and calcitonin treatment in ovariectomized rats. *Bone.* 2007; 41:786-93.

Who. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series. 1994; 843: 1-129.

Włodarski, KH, Galus R, Brodzikowska A, Włodarski PK. Sclerostin, an osteocytes-derived bone-forming inhibitor. *Pol Orthop Traumatol.* 2013; 1; 78: 151-4.

Yamamoto T, Nagaoka N, Hirata A, Nakamura H, Inoue M, Kawai M, *et al.* Ultrastructural and immunohistochemical studies of medullary bone calcification, with special reference to sulphated glycosaminoglycans. *J Electron Microsc.* 2005; 54 (1): 29-34.

Young MF, Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003.14 (Suppl 3): S35–S42.

Abstract

Introduction: Bone tissue is composed by cells and a calcified extracellular matrix. The imbalance between the rate of bone formation and reabsorption can lead to osteoporosis. Strontium ranelate (SrR) is indicated for severe osteoporosis treatment, although it is unclear whether its action on bone tissue can be enhanced when combined with mechanical vibration. **Aim:** To investigate bone tissue changes of osteopenic rats submitted to treatment with strontium ranelate, associated with low intensity and frequency mechanical vibration. **Methods:** Forty female *Wistar* rats were ovariectomized and after three months divided into 4 groups: Group I (control) - gavage with vehicle solution; Group II - gavage with 625 mg/kg/day of SrR; Group III – submitted to mechanical vibration (20 min., 60Hz/0.6g/day); Group IV - gavage with 625 mg/kg/day of SrR + mechanical vibration (20 min., 60Hz/0.6g/day). The animals were weekly weighed and underwent bone densitometry at the beginning and after 90 days of treatment. After euthanasia, the femurs bone were processed for histomorphometric, histochemistry (Picro-Sirius red) and biochemistry analyzes. Some sections were subjected to TRAP method for osteoclasts quantification. Tibiae and vertebrae were frozen for biophysical and biomechanical analyzes. All results were statistically analyzed. **Results:** The SrR group was the only one that exhibited gain in all parameters analyzed by densitometry (BMD, BMC and area), in both regions (whole body and femur-tibiae) analyzed; also showed the highest BMD at the end of the treatment. There was a thickness and length increase in the tibia of the SrR + VBM group, while the SrR group showed only increased thickness in the femurs. The largest bone volume, load bearing capacity, stiffness and toughness were observed in the tibias and vertebrae of SrR group. The VBM group had higher percentage of organic material and bone volume in the tibia, and in the SrR and SrR+VBM showed greater mineral density and percentage of organic material in the vertebrae. Histomorphometric analyzes revealed higher trabecular bone volume in the femur of the SrR and SrR+VBM groups compared to VBM group, but only the SrR group was higher than Control. Thickness of cortical bone was high, both in the SrR and SrR+VBM groups. The biggest red birefringence was observed in the SrR+VBM group, and the largest green in VBM group. There was a decrease in the levels of chondroitin sulfate in all treated groups compared to Control. The amount of hyaluronic acid was higher in the VBM group.

Conclusion: The strontium ranelate treatment associated with mechanical vibration, as well as strontium ranelate administered alone, exerted positive effects on bone tissue constituents, accelerating bone remodeling and promoting the reestablishment of bone microarchitecture in osteopenic rats.