

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO NA
ARTRODESE LOMBAR EM RATAS OSTEOPORÓTICAS

Cleiton Dias Naves

Rio de Janeiro
2019

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO NA
ARTRODESE LOMBAR EM RATAS OSTEOPORÓTICAS**

Cleiton Dias Naves

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof^ª. Dr^a. Amanda Cavalcanti
Prof^ª. Dr^a. Ana Carolina Leal

Rio de Janeiro
Fevereiro
2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

N323a Naves, Cleiton Dias.

Avaliação do efeito do tratamento com alendronato na artrodese lombar em ratas osteoporóticas / Cleiton Dias Naves. — 2018.
66f.

Orientadores: Amanda Cavalcanti e Ana Carolina Leal.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2018.

1. Fusão vertebral. 2. Artrodese Lombar. 3. Osteoporose. 4. Alendronato. 5. Biomodelos. 6. Ratas. 7. Ortopedia. I. Cavalcanti, Amanda; Leal, Ana Carolina, orient. II. Título.

NLM WE 348

ATA DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS AO SISTEMA
MUSCULOESQUELÉTICO APRESENTADA E DEFENDIDA POR CLEITON
DIAS NAVES

No vigésimo sexto dia do mês de fevereiro de dois mil e dezenove, às nove horas, reuniu-se no Auditório do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado apresentada e defendida por Cleiton Dias Naves, intitulada “Avaliação do Efeito do Tratamento com Alendronato na Artrodese Lombar em Ratas Osteoporóticas”. A Comissão Examinadora foi organizada obedecendo ao disposto no Regulamento do Curso de Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, área de concentração em Morfologia, estando constituída pelos Professores: Diego Pinheiro Aguiar, docente do corpo permanente do Mestrado, sendo designado, conforme o regulamento, Presidente da Banca; Alfredo Marques Villardi do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad; Rafaela Sartore da Costa Gomes do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad e Amanda dos Santos Cavalcanti e Ana Carolina Leal de Oliveira como orientadoras, sem direito a voto. Após haver o candidato apresentado os resultados de sua dissertação, obedecendo ao prazo regimental, foi dada a palavra aos examinadores para arguição na seguinte ordem: Alfredo Marques Villardi, Rafaela Sartore da Costa Gomes e Diego Pinheiro Aguiar, tendo o candidato respondido as perguntas formuladas. Logo após reuniu-se a Comissão Examinadora para proceder ao julgamento, tendo decidido APROVADO o candidato para receber o Grau de **Mestre** em Ciências. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão deu por encerrado os trabalhos e foi lavrada a presente Ata que vai devidamente assinada pelos Examinadores, pelas orientadoras e pelo aluno.

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2019.

Alfredo Marques Villardi

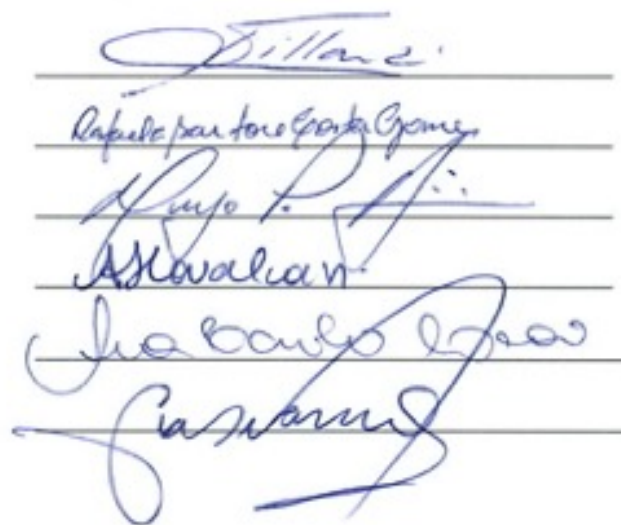
Rafaela Sartore da Costa Gomes

Diego Pinheiro Aguiar

Amanda dos Santos Cavalcanti

Ana Carolina Leal de Oliveira

Cleiton Dias Naves



The block contains five handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to: Alfredo Marques Villardi, Rafaela Sartore da Costa Gomes, Diego Pinheiro Aguiar, Amanda dos Santos Cavalcanti, and Cleiton Dias Naves. The signatures are fluid and cursive.

Dedico essa dissertação ao Deus vivo de Israel, por estar sempre presente em todos os momentos de minha jornada terrestre; a minha filha Maria Luiza, ao meus pais e a minhas exímias orientadoras, por propagar a ciência em nosso país.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que hoje eu esteja concluindo mais uma etapa de formação acadêmica; ao inesgotável esforço de minhas orientadoras Amanda Cavalcanti e Ana Carolina Leal, que superaram todos os obstáculos para que esse trabalho fosse concluído; à estimada Prof. Dr. Maria Eugênia e ao Dr. João Matheus, que sempre foram entusiastas desse projeto e não mediram recursos para sua concretização, ao meu amigo Gustavo Cesar de Almeida Peçanha que caminhou comigo lado a lado na execução desse projeto, à minha amada esposa, Camila Naves, pela inexorável tolerância e paciência em compreender meu finito tempo ao conciliar a dedicação à vida pessoal com minha carreira acadêmica; aos meus pais, pelo alicerce sólido construído com muito sacrifício e amor; e ao Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), onde, após minha graduação em Medicina na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, completei minha formação em Ortopedia e Traumatologia, Cirurgia da Coluna Vertebral e, agora, na iminência da defesa do meu mestrado.

RESUMO

NAVES, Cleiton Dias. Avaliação do efeito do tratamento com alendronato na artrodese lombar em ratas osteoporóticas. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2019.

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela redução da densidade mineral óssea. Estima-se que 200 milhões de pessoas possuam osteoporose no mundo. A doença é fator de risco para falha do processo de fusão vertebral, que consiste na consolidação de vértebras adjacentes através da colocação de enxertia óssea e estabilização mecânica, fundamental para o sucesso das cirurgias da coluna vertebral. O alendronato é um medicamento antirreabsortivo utilizado no tratamento da osteoporose. Apesar de sua eficácia, sugere-se que retarda o processo de remodelamento no sítio cirúrgico da fusão vertebral, atrasando a osteointegração do enxerto aos corpos vertebrais. Ainda não há consenso sobre a melhor abordagem medicamentosa para os pacientes osteoporóticos que se encontram em uso crônico de alendronato e que serão submetidos ao procedimento cirúrgico de fusão vertebral. Este estudo avaliou o efeito do alendronato na consolidação óssea do procedimento de fusão vertebral em ratas osteoporóticas. Quinze ratas da linhagem Sprague Dawley foram divididas em três grupos: Grupo Não-OVX (n=3) - ratas não submetidas a ooforectomia e submetidas a fusão espinhal; Grupo OVX (n=5) - ratas submetidas a ooforectomia entre 8 a 12 semanas de vida e à fusão vertebral 12 semanas após a ooforectomia e Grupo ALN (n=7) - ratas ooforectomizadas e submetidas a fusão vertebral que receberam semanalmente 70µg/kg de alendronato iniciado 5 semanas antes da fusão vertebral e mantido até a eutanásia. Foram coletadas amostras de sangue semanalmente e os animais foram submetidos a eutanásia 8 semanas após a fusão vertebral. A condição osteoporótica foi confirmada através da dosagem por ELISA dos níveis plasmáticos de CTX-I 12 semanas após ooforectomia, que foi maior no grupo OVX em relação ao grupo Não-OVX (p=0,0086). Os parâmetros da microestrutura do corpo vertebral medidos através da microtomografia computadorizada (µCT) denotam redução na fração de volume ósseo (BV/TV) (p=0,116), no número de trabéculas (Tb.N) (p=0,116), na espessura das trabéculas (Tb.Th) (p=0,033), e leve aumento na desconexão entre as trabéculas (Tb.pf p = 0,086). Quanto à eficiência da fusão, a avaliação radiográfica do segmento lombar revelou taxa de fusão de 75% (3/4) no grupo Não-OVX, 100% (3/3) no grupo OVX e nenhuma fusão no grupo ALN. Pela avaliação manual, os resultados foram semelhantes para os grupos Não-OVX e OVX e de 57,1% (4/7) no grupo ALN. A avaliação dos aspectos estruturais da massa da fusão por µCT revelou maior BV/TV (p ≤ 0,05), maior Tb.N (p ≤ 0,01), maior espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) (p ≤ 0,01) e Conn.Den (p = 0,02) no grupo ALN em relação aos grupos OVX e não OVX. O grupo ALN também apresentou maior Tb.Th (p = 0,04) e menor Tb.pf (p = 0,03) do que o grupo OVX. As ratas osteoporóticas submetidas a cirurgia de fusão vertebral e tratadas com alendronato apresentaram menor taxa de fusão vertebral, apesar de possuir melhor qualidade da massa de fusão. Imaginávamos que o tratamento crônico com alendronato, assim como o tratamento iniciado após a cirurgia, leve à formação de massas de fusão com maior qualidade trabecular e mais exuberantes, porém, diferente do observado quando o tratamento é iniciado após a cirurgia, não resulta em aumento na taxa de fusão.

Palavras-chave: Fusão vertebral. Artrodese lombar. Osteoporose. Alendronato. Biomodelos. Ratas. Ooforectomia.

ABSTRACT

NAVES, Cleiton Dias. Evaluation of alendronate treatment on lumbar arthrodesis in osteoporotic rats. Rio de Janeiro, 2019. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2019.

Osteoporosis is an osteometabolic disorder characterized by reduced bone mineral density. About 200 million people are affected in the world and the disease is a risk factor for pseudoarthrosis in spinal fusion. Alendronate is a bisphosphonate medication that inhibits bone resorption and is used to treat osteoporosis. Despite its effectiveness, it is suggested that it impairs bone remodeling at the surgical site of spinal fusion, delaying the osteointegration of the bone graft to the vertebral bodies. There is still no consensus on the best approach for osteoporotic patients who are in chronic use of alendronate and who will undergo surgical procedure for spinal fusion. This study sought to examine the effect of the chronic use of alendronate on bone formation of spinal fusion in osteoporotic rats. Fifteen Sprague Dawley adult female rats were divided into three groups: Non-OVX (n=3) – non-ovariectomized rats submitted to posterolateral lumbar spinal fusion; OVX (n=5) - rats submitted to ovariectomy at 8 – 12 weeks of age and to posterolateral lumbar spinal fusion 12 weeks later; and ALN (n = 7) – ovariectomized rats submitted to spinal fusion in which weekly subcutaneous injections of Alendronate (70µg/kg) were administered from 5 weeks before the spinal fusion until euthanasia. Blood samples were collected weekly and euthanasia was performed 8 weeks after the spinal fusion procedure. Development of osteoporosis was evaluated through the plasmatic dosage of CTX-I, in which we observed a significant increase in the OVX group (p=0.0086). Bone loss was confirmed by micro-CT analysis of the fourth lumbar vertebra, with slightly reduction in the bone volume (BV/TV) (p=0.116), trabecular number (Tb.N) (p=0.116), significantly reduction in the trabecular thickness (Tb.Th) (p=0.033), and slightly increase in the trabecular bone pattern factor (TB.pf) (p = 0.086). Radiographic evaluation of the lumbar spine revealed fusion rate of 75% (3/4) in Non-OVX, 100% (3/3) in OVX, and no fusion in ALN. According to manual palpation, we observed similar results for the non-OVX and OVX group, while in the ALN group we observed 57.1% (4/7) of fusion rate. New bone formation identified on µCT imaging of bilaterally fused specimens demonstrated a higher BV/TV (p ≤ 0.05), Tb.N (p ≤ 0.01), Tb.Sp (p ≤ 0.01), and connective density (Conn.Den, p = 0.02) in ALN than in non-OVX and OVX groups. The alendronate also improved the Tb.Th (p = 0.04) and Tb.pf (p = 0.03) in comparison to OVX group. This study demonstrates that, despite the better quality of new bone formation after long term administration of alendronate in osteoporotic rats submitted to posterolateral spinal fusion, the treatment does not improve the fusion rates.

Key-words: Spinal fusion. Posterolateral lumbar fusion. Osteoporosis. Alendronate. Rats. Ovariectomy.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Cirurgias de fusão vertebral	15
1.1.1 Cirurgias de fusão vertebral em pacientes osteoporóticos	17
1.1.1.1 O alendronato e as cirurgias de fusão vertebral.....	18
1.2 Osteoporose.....	20
1.2.1 Definição, classificação e epidemiologia	20
1.2.2 Aspectos moleculares da osteoporose.....	23
1.2.2.1 Remodelamento ósseo	23
1.2.2.2 Papel do estrogênio na regulação do remodelamento ósseo.....	25
1.2.3 Tratamento da Osteoporose.....	27
1.2.3.1 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos e do alendronato	29
1.2.3.2 Vantagens e desvantagens no uso do alendronato	30
2 Justificativa e hipótese	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo principal	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Aspectos éticos.....	34
4.2 Desenho Experimental.....	34
4.3 Manutenção dos animais	35
4.4 Técnica cirúrgica.....	35

4.4.1	Anestesia	35
4.4.2	Ooforectomia	36
4.4.3	Fusão pósterolateral (dorso lateral) da coluna	37
4.5	Controle da dor e antibioticoterapia	39
4.6	Coleta de amostras	40
4.7	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	40
4.8	Análise radiográfica	41
4.9	Avaliação manual da fusão	41
4.10	Análise por microtomografia (μCT).....	41
4.11	Análises dos dados.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Estabelecimento do modelo de osteoporose	44
5.2	Avaliação do tratamento com alendronato sobre a formação da massa de fusão.....	47
5.2.1	Avaliação da fusão.....	47
5.2.2	Avaliação das propriedades estruturais da massa de fusão por morfometria 3D	48
6	Discussão	52
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	66
	APÊNDICE.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALN	Alendronato
ANOVA	Análise da variância
BV/TV	<i>Bone Volume / Total Volume</i> (Volume ósseo/ Volume total)
DMO	Densidade mineral óssea
BMU	<i>Basic Multicellular Units</i> (Unidades multicelulares básicas)
°C	Graus Célcus
CAM50	Concentração alveolar mínima 50%
CEUA	Comissão de ética do uso em animais
cm	Centímetro
CSF-1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i> (Fator Estimulador de Colônia -1)
CTX-1	Porção carboxiterminal do telopeptídio de degradação de colágeno
DP	Desvio padrão
DXA	Raio X de dupla absormetria – Densitometria óssea
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimático)
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GM-CSF	<i>Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Fator estimulador de formação de colônia de granulócitos e macrófagos)
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> (cinase c-Jun N-terminal)
KV	Kilovolt
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (Proteína quimiotática de monócito -1)
MCSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Fator estimulador de formação de colônia de macrófagos)
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
ms	Milisegundo
NaCl	Cloreto de sódio
Não-OVX	Não ooforectomizado
NBHA	<i>National Bone Health Alliance</i> (Aliança nacional da saúde do osso)
NFκβ	<i>Nuclear factor κβ</i> (Fator Nuclear κβ)
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (Instituto Nacional de Saúde dos EUA)
NOF	<i>National Osteoporosis Foundation</i> (Fundação nacional de osteoporose)
OA	Osteoartrose
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ooforectomia
PGE	Prostaglandina E
PGE 2	Prostaglandina E2
PR	Paraná

PTH	Paratormônio
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$</i> (Receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$)
RANK L	Ligante do receptor RANK
ROI	<i>Region of interest</i> (Região de interesse)
RPM	Rotações por minuto
SP	São Paulo
Tb.N	<i>Trabecular number</i> (Número de trabéculas)
Tb.pf	<i>Trabecular bone pattern factor</i> (Fator de padrão de osso trabecular)
Tb.th	<i>Trabecular thickness</i> (Espessura trabecular)
TC	Tomografia Computadorizada
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i> (Fator de crescimento transformador beta)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TNF ALFA	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
UI	Unidades internacionais
VOI	<i>Volume of interest</i> (Volume de interesse)
μ CT	<i>Micro computed tomography</i> (Microtomografia Computadorizada)
μ m	Micrômetro
2D	Dois dimensões
3D	Três dimensões

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tomografia Computadorizada (TC) da coluna vertebral após fusão vertebral.	17
Figura 2 Microarquitetura do tecido ósseo.....	21
Figura 3: Fases do remodelamento ósseo.....	24
Figura 4: Efeito do estrogênio sobre a regulação da reabsorção óssea.....	26
Figura 5 : Efeito dos fármacos antiabsortivos sobre a densidade mineral óssea (DMO) (A); e sobre a ocorrência de novas fraturas vertebrais em pacientes osteoporóticos (B).	29
Figura 6 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos.....	30
Figura 7 Desenho Experimental do estudo.	35
Figura 8 Ooforectomia em ratas.....	37
Figura 9 Preparo de enxerto ósseo autólogo extraído da cauda do animal.	38
Figura 10 Posicionamento do enxerto ósseo na cirurgia de fusão posterolateral da coluna vertebral.	39
Figura 11. Quantificação dos níveis plasmáticos de carboxitelopectídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I (CTX-I).....	44
Figura 12. Caracterização da microarquitetura em ratas ooforectomizadas (OVX).	46
Figura 13 Avaliação Radiográfica.	48
Figura 14 Modelo de avaliação da microarquitetura da massa de fusão.....	49
Figura 15 Avaliação da microarquitetura óssea da massa de fusão vertebral.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Alterações celulares e moleculares no microambiente ósseo na ausência de estrogênio	27
Tabela 2 : Medicamentos disponíveis no Brasil para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.	28
Tabela 3 Avaliação da fusão segundo avaliação radiográfica e avaliação manual.	47

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos alcançados pelas ciências da saúde proporcionaram o aumento da expectativa de vida da população (DALL et al., 2013). Segundo estatísticas norte-americanas, a população acima de 65 anos aumentará de 13% em 2010 para 20% em 2040 (BUREAU e US CENSUS BUREAU, 2010), o que prediz especial atenção a esse grupo etário. No Brasil, projeta-se que o índice de envelhecimento (relação entre o número de idosos e o de jovens em uma população), que era 10,5 em 1920 e 39,3 em 2010, será de 152,9 em 2040 (MIRANDA et al., 2016). A projeção demográfica aponta que, em 2050, os idosos representarão 23% da população, alterando a epidemiologia dos agravos à saúde. Estima-se que as doenças crônicas não transmissíveis tornar-se-ão mais prevalentes que as doenças infectocontagiosas (BACCARO et al., 2015). Dessa forma, espera-se o aumento da ocorrência de doenças degenerativas do sistema osteoarticular, incluindo os distúrbios da coluna vertebral, em função de morbididades associadas neste grupo de pacientes, como a baixa densidade mineral óssea e a osteoporose, redução da mobilidade, espondiloartrose e deformidades da coluna vertebral, alteração do equilíbrio e maior propensão à quedas (FEHLINGS et al., 2015). Em consequência, nos últimos anos ocorreu um aumento no número de procedimentos cirúrgicos para o tratamento dessas patologias (BURGE et al., 2007) e, nesse contexto, as cirurgias de fusão vertebral se tornaram mais frequentes, aumentando de 0,3 por 1000 em 1992 para 1,1 por 1000 em 2003 (WEINSTEIN et al., 2006).

A técnica cirúrgica de fusão vertebral ou artrodese lombar é indicada para estabilização de um segmento vertebral e consiste na retirada do disco intervertebral doente, descompressão e liberação dos elementos neurais e colocação de enxerto ósseo no espaço interssomático (MOBBS et al., 2015). Em seguida, o organismo inicia um complexo processo biológico de consolidação nas áreas receptoras do enxerto, culminando com a união rígida e estável de ambas

as vértebras, processo este semelhante ao de “soldagem” em indústrias (CANNESTRA et al., 2016).

O sucesso deste processo está relacionado à biologia do indivíduo e ao potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor do enxerto utilizado. Caso esse processo sofra alguma falha, pode ocorrer uma não-união, ou seja, uma pseudoartrose (KAMATH et al., 2014). Osteoporose, tabagismo e múltiplas abordagens cirúrgicas são fatores associados à pseudoartrose e outras complicações cirúrgicas (ANDERSEN et al., 2010; PEARSON et al., 2016).

Visando otimizar o sucesso do procedimento cirúrgico de fusão vertebral em pacientes idosos, portadores de osteoporose, direcionando esforços para alcançar a maior taxa de consolidação possível, torna-se interessante estudar o efeito do medicamento de primeira linha preconizado no país para tratamento da osteoporose na consolidação óssea após fusão vertebral.

1.1 Cirurgias de fusão vertebral

O tratamento cirúrgico das doenças degenerativas da coluna vertebral objetiva o alívio dos sintomas álgicos e a estabilização mecânica das vértebras (FRIEDLY et al., 2010). Dados do *National Institute of Health* (NIH) (Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos) revelam que 80% da população norte americana sofre de dor lombar baixa ao menos uma vez na vida, sendo que de 1% a 2% dessas pessoas se afastarão de suas atividades laborativas, onerando cada vez mais o sistema previdenciário (PATRICK et al., 2014). Um estudo demonstrou que nos Estados Unidos há uma prevalência de 25,7% de lombalgia na população economicamente ativa (YANG et al., 2017).

Dentre os procedimentos cirúrgicos na coluna vertebral, a eficácia da fusão vertebral ou artrodese vertebral é bem estabelecida na literatura para o tratamento de doença degenerativa discal (FRIEDLY et al., 2010).

A fusão vertebral é um procedimento cirúrgico que associa enxertia óssea à estabilização mecânica, a fim de promover a consolidação de vértebras adjacentes. O cirurgião prepara o espaço interssomático, cruentizando os platôs vertebrais proximal e distal, a fim de retirar todo tecido discal e cartilaginoso, deixando o ambiente propício para osteointegração do enxerto às vértebras. Em seguida, o sistema é estabilizado com parafusos pediculares, hastes e conectores (FRITZELL et al., 2003).

Os aspectos biomecânicos e os biológicos inerentes ao organismo do paciente são os fatores que determinam o desfecho do procedimento cirúrgico (SILVA e LENKE, 2010). O sucesso do tratamento cirúrgico é alcançado pela fusão sólida entre as vértebras ao final do processo de consolidação óssea, que leva de 6 a 12 meses. A fusão é observada através de exames de imagem, quando não há radiolusência entre as vértebras proximal e distal, denotando total osteointegração do enxerto ósseo em ambas as suas interfaces (**Figura 1A**).

A pseudoartrose, ou falha na fusão vertebral (**Figura 1B**), ocorre entre 5 e 35% dos procedimentos cirúrgicos de fusão vertebral (CHUN et al., 2015). A falha pode estar relacionada a técnica cirúrgica ou a fatores biológicos. A técnica cirúrgica executada de maneira inadequada gera sobrecarga biomecânica e culmina com a quebra do material de síntese (SMITH e AMES, 2013; BERJANO e LAMARTINA, 2014). Quanto aos fatores biológicos, os principais fatores de risco para a falha são tabagismo, etilismo, baixa quantidade de vitamina D e de cálcio, uso crônico de glicocorticoides e osteoporose (PINHEIRO et al., 2009).

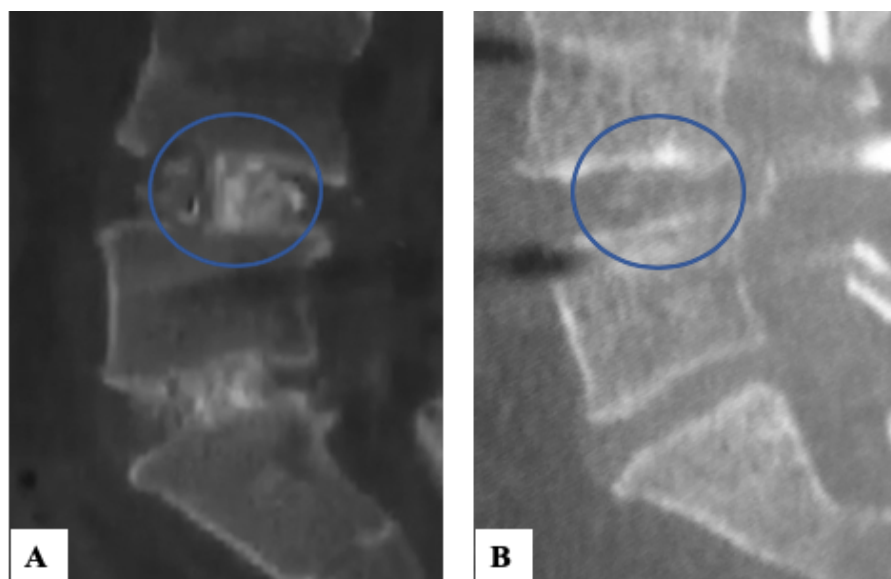


Figura 1. Tomografia Computadorizada (TC) da coluna vertebral após fusão vertebral. (A) Massa de fusão evidenciando consolidação total entre as vértebras. (B) Linha de radioluscência entre as vértebras L4-L5 denotando falha na fusão ou pseudoartrose. (Imagens do acervo pessoal)

1.1.1 Cirurgias de fusão vertebral em pacientes osteoporóticos

A cirurgia de fusão vertebral em pacientes acometidos pela osteoporose apresenta algumas peculiaridades típicas do esqueleto com fragilidade óssea (PARK e CHUNG, 2011). Durante o ato cirúrgico é notório ao cirurgião uma menor resistência à inserção dos parafusos pediculares, devido à redução do número de trabéculas ósseas. Consequentemente, há redução da pega, ou seja, da força com que o parafuso se fixa ao osso, reduzindo assim a resistência do sistema ao arrancamento (*pull-out*) do parafuso durante uma sobrecarga mecânica. A ocorrência de arrancamento varia de 15% a 45% em pacientes osteoporóticos (OHTORI et al., 2013; TU et al., 2014).

Atualmente, há diversos implantes voltados para a abordagem de pacientes com osteoporose, disponíveis no mercado. A técnica de colocação de metilmetacrilato ao redor do parafuso pedicular (conhecida como *augmentation*) melhora a integração entre a interface parafuso-osso e aumenta a força de resistência (SARZIER et al., 2002; BECKER et al., 2008). Entretanto, pode aumentar a carga sobre a vertebra adjacente, facilitando seu colapso

(POLIKEIT et al., 2003). Outro dispositivo utilizado em pacientes com fragilidade óssea são os parafusos pediculares com passos de roscas distintos na região proximal e distal. Esse *design* aumenta a adesão e a osteointegração da região proximal do parafuso ao osso acometido pela osteoporose (MUMMANENI et al., 2002). Também encontra-se disponível um parafuso expansível, específico para pacientes com fragilidade óssea (GUTIERREZ et al., 2013).

Compreendendo que o complexo processo de consolidação óssea envolve aspectos biológicos como fatores celulares, imunológicos, humorais e bioquímicos, estão descritas outras abordagens para o sucesso da fusão vertebral em pacientes osteoporóticos, como suplementação de cálcio (CHO et al., 2012) e de vitamina D (BISCHOFF-FERRARI et al., 2005; BOONEN et al., 2006). Neste estudo não abordaremos os aspectos relacionados à suplementação ou técnica cirúrgica e focaremos no efeito do alendronato sobre o desfecho das cirurgias de fusão vertebral em pacientes com fragilidade óssea.

1.1.1.1 O alendronato e as cirurgias de fusão vertebral

Os bisfosfonatos são os medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde no Brasil como medicação de primeira linha para o tratamento da osteoporose primária, por apresentarem efeito inibidor sobre a atividade osteoclástica. É uma classe de medicamento eficaz em prevenir fraturas por fragilidade e reduzir o risco de novas fraturas, tanto no esqueleto apendicular quanto no axial (RADOMINSKI et al., 2017).

Apesar de sua eficácia no tratamento da osteoporose, estudos em biomodelos e em humanos sugerem que devido à sua ação sobre a redução do número e da função dos osteoclastos, os bisfosfonatos podem prejudicar a consolidação óssea (HUANG et al., 2005) ao retardar o remodelamento no sítio cirúrgico da fusão vertebral atrasando a osteointegração do enxerto ósseo aos corpos vertebrais (LEHMAN et al., 2004; HUANG et al., 2005; PARK; CHUNG, 2011). Portanto, quando se planeja uma cirurgia de fusão vertebral em paciente com

osteoporose, os cirurgiões devem considerar a utilização de outro medicamento antirreabsortivo, ou mesmo considerar o uso de um medicamento de ação anabólica no período pós-operatório (PARK e CHUNG, 2011).

Uma recente meta-análise com nove ensaios clínicos avaliou em humanos o efeito do uso dos bisfosfonatos em pacientes osteoporóticos submetidos à cirurgia de fusão vertebral. Constatou-se melhora na taxa de fusão no grupo de pacientes que recebeu bisfosfonatos, sem complicação expressiva (STONE et al., 2017).

Os biomodelos auxiliam no estudo das bases biológicas de novas estratégias para tratamento de diversas afecções humanas, inclusive para o manejo pós-operatório de pacientes osteoporóticos. Nesse sentido, alguns biomodelos de fusão vertebral foram desenvolvidos em coelhos, ovelhas e outras espécies animais. No entanto, o modelo em ratos apresenta algumas vantagens, como a facilidade de manutenção, o custo dos novos tratamentos propostos, o tamanho do enxerto, a possibilidade de desenhos experimentais mais robustos, além de permitir o estudo de mecanismos moleculares envolvidos na consolidação (DRESPE et al., 2005).

O uso contínuo do alendronato em biomodelo de osteoporose, com fratura de osso longo associada à fixação não rígida retarda o processo de consolidação (HAUSER et al., 2018). Da mesma forma, uma meta-análise apontou que o alendronato retarda o remodelamento da massa óssea em modelos animais submetidos à fusão vertebral (HIRSCH et al., 2013).

Um outro estudo em ratas osteoporóticas submetidas à fusão vertebral mostrou alteração no processo de consolidação do enxerto ósseo. O bisfosfonato inibiu a ossificação endocondral e a reabsorção do enxerto ósseo, porém induziu o crescimento de uma massa óssea maior e mais densa que a encontrada no grupo controle. Os autores recomendaram que a utilização de bisfosfonatos fosse suspensa temporariamente no período pós-operatório de cirurgias de fusão vertebral (TAKAHATA et al., 2008).

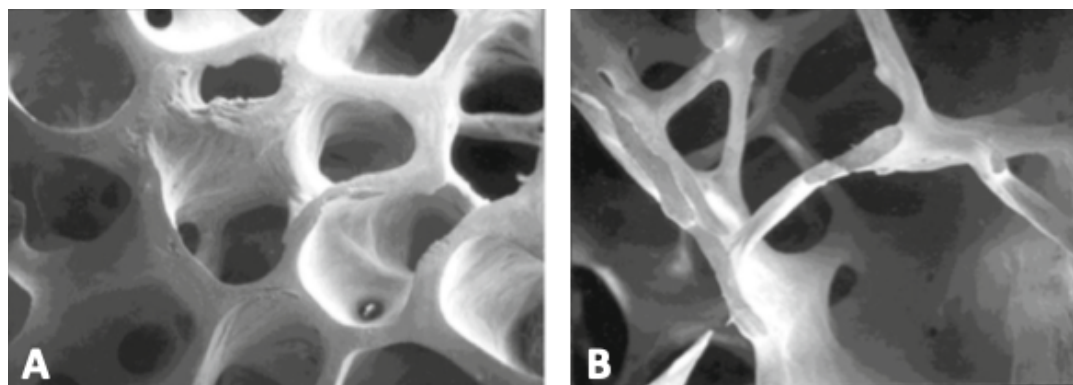
Assim, com base nos estudos em humanos e em modelos animais, ainda não há consenso

sobre a melhor abordagem medicamentosa para os pacientes osteoporóticos que se encontram em uso crônico de alendronato. Atualmente, não há um protocolo do Ministério da Saúde ou das sociedades de especialidade médica que defina como conduzir esse paciente quando na iminência da cirurgia de fusão vertebral. Cada serviço define de maneira individualizada a abordagem frente à medicação que o paciente utiliza, e em alguns casos, o uso desse medicamento pode ser até negligenciado.

1.2 Osteoporose

1.2.1 Definição, classificação e epidemiologia

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela redução da densidade mineral óssea (DMO) e pela alteração da microarquitetura óssea, (**Figura 2**) que resultam em fragilidade e consequente aumento da susceptibilidade à fraturas por traumas de baixa energia (SZULC e BOUXSEIN, 2011; RADOMINSKI et al., 2017). Tornou-se um problema de saúde pública, principalmente devido aos agravos psicossociais e econômicos envolvidos no curso do tratamento de fraturas em idosos (MARINHO et al., 2014). É uma doença crônica, silenciosa e sem manifestação específica, dificultando assim uma abordagem preventiva (DEAL, 1997; MARINHO et al., 2014). O diagnóstico é confirmado pela presença de fratura após trauma leve, a qual não ocorreria em indivíduo saudável, ou através da constatação de DMO abaixo do valor limite, mensurada através do exame densitometria óssea (DMO) (BACCARO et al., 2015).



Osso normal

Osso osteoporótico

Figura 2. Microarquitetura do tecido ósseo. Osso normal (A) e osso osteoporótico (B). Observa-se aumento do espaço entre as trabéculas ósseas, consequentes da redução da massa óssea. Adaptado de COSMAN et al. (2014).

A doença pode ser classificada em primária (ou idiopática) ou secundária. A forma primária se subdivide em Tipo 1 e Tipo 2. A Tipo 1 ocorre após a menopausa devido aos baixos níveis de estrogênio, acometendo tipicamente mulheres entre 50 e 60 anos e homens com hipogonadismo. A Tipo 2, também chamada de osteoporose senil, acomete homens e mulheres com mais de 70 anos de idade, geralmente em decorrência da deficiência de cálcio e alterações relacionadas ao paratormônio. A osteoporose secundária ocorre devido a outro agravo clínico de origem inflamatória ou relacionado à alterações hormonais, ou ainda ao uso contínuo de medicações como os glicocorticoides, por exemplo (GALI, 2001; GRAZIO et al., 2011).

Estima-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas no mundo possuam osteoporose (REGINSTER e BURLET, 2006). A doença é cerca de 2,5 vezes mais comum nas mulheres (MARTINI et al., 2009). Na população norte americana, ocorre em 15,4% das mulheres acima de 50 anos e em 34,9% das mulheres acima de 80 anos (BACCARO et al., 2015). No Brasil, varia entre 15 e 33%, dependendo da metodologia do estudo ou do critério diagnóstico (BACCARO et al., 2015).

São considerados fatores de risco não modificáveis para osteoporose primária: a idade, ser do sexo feminino, etnia asiática ou caucasiana, ter sofrido ou ser parente de quem sofreu

fratura por fragilidade, baixa DMO no colo femoral, baixo índice de massa corporal (IMC) e uso de mais de 5mg/dia de prednisona, por três meses consecutivos. Além desses fatores, sedentarismo, baixa ingestão de cálcio, tabagismo e alcoolismo também são considerados fatores comportamentais modificáveis (revisado por COSMAN et al., 2014).

A osteoporose é a causa mais comum de fraturas vertebrais causadas por traumas de baixa energia, as chamadas fraturas osteoporóticas ou fraturas por fragilidade óssea (TOMÉ-BERMEJO et al., 2017). É também a causa mais comum de fraturas em pessoas com mais de 50 anos (RADOMINSKI et al., 2017). Nos Estados Unidos, ocorrem mais de 2 milhões de fraturas osteoporóticas todos os anos (BURGE et al., 2007). As fraturas osteoporóticas ocorrem mais comumente nas vértebras (27%), seguidas do punho (19%), quadril (14%), pelve (7%); e 33% nos demais ossos (BURGE et al., 2007; CHIN et al., 2007). Ademais, em pacientes acima de 50 anos de idade submetidos à cirurgia da coluna vertebral, a osteoporose está presente em 14,5% dos homens e 51,3% das mulheres (CHIN et al., 2007).

Os custos com o tratamento das fraturas osteoporóticas em 2005 nos Estados Unidos foram de cerca de 17 bilhões de dólares e projeta-se que esse custo aumente para 25,3 bilhões de dólares até 2025 (BURGE et al., 2007). Na China, uma projeção realizada em 2015 previu que o número e o custo anual com as fraturas relacionadas à osteoporose dobrará em 2035 e chegará a 5,99 milhões de fraturas, ao custo de 25,43 bilhões de dólares em 2050. O substancial impacto econômico desse agravamento demanda políticas públicas para o controle da doença e esforços para o diagnóstico precoce (SI et al., 2015).

1.2.2 Aspectos moleculares da osteoporose

1.2.2.1 Remodelamento ósseo

O tecido ósseo possui função de sustentação dos demais tecidos e, macroscopicamente, aparenta-se rígido e tenaz; porém microscopicamente encontra-se em elevada atividade metabólica, renovando-se completamente a cada 10 anos devido ao remodelamento ósseo (PARK e CHUNG, 2011).

O compartimento de remodelamento ósseo é formado pela unidade multicelular básica (BMU, do inglês *basic multicellular units*) juntamente com as células da superfície óssea, as chamadas *bone-lining cells*, e os capilares (KHOSLA et al., 2008).

Didaticamente, o remodelamento ósseo é dividido em cinco fases: ativação, reabsorção, inversão, formação e fase terminal (**Figura 3**). Conforme revisado por Raggatt e Partridge (2010), a fase de ativação ocorre em resposta a um dano ao esqueleto, gerado por estresse mecânico ou por sinalização hormonal. No estado basal, os osteócitos secretam o fator de crescimento transformador β (TGF- β , do inglês *Transforming growing factor β*), inibidor da osteoclastogênese. A redução no número de osteócitos resulta na ativação dos osteoclastos. Além disso, os osteoblastos secretam a Proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1, do inglês *Monocyte chemoattractant protein-1*), promovendo o recrutamento de células mononucleares precursoras de osteoclastos. Secretam ainda o fator estimulador de formação de colônia tipo 1 (CSF-1, do inglês *colony stimulating factor*) e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, do inglês *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), que promovem a proliferação dos precursores osteoclásticos e sua diferenciação em osteoclastos maduros. Os osteoclastos são então capazes de se ancorar à matriz, formando as lacunas de reabsorção de Howship, que favorecem, em última análise, a degradação da matriz mineralizada.

A fase de reversão é caracterizada pela reabsorção da matriz não mineralizada que persiste na lacuna de Howship após a ação osteoclástica ocorrida na fase de reabsorção. O colágeno tipo I é o principal componente orgânico degradado, resultando na liberação do carboxitelopectídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I (CTX-1, do inglês *C-Terminal-Telopeptide of type I collagen*) que pode ser utilizado como marcador da reabsorção óssea (BONDE et al., 1994). Proteoglicanos, proteínas glicosiladas e lipídeos, dentre outros, compõem o restante do material orgânico que é reabsorvido nessa fase. Por fim, inicia-se a fase terminal que é caracterizada pela deposição de matriz. Os osteoblastos entram em apoptose ou ficam embebidos na matriz mineralizada diferenciando-se em osteócitos e concluindo o ciclo até a próxima onda de remodelamento (Baron, 2008).

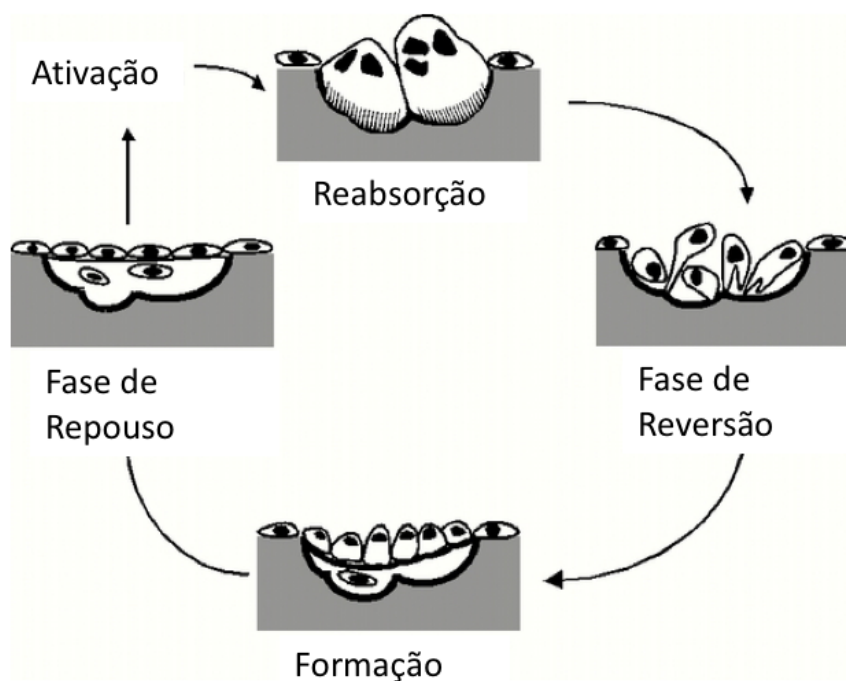


Figura 3. Fases do remodelamento ósseo. Representação esquemática das cinco fases do processo de remodelamento ósseo. O processo é ativado quando há microdanos no osso. A Reabsorção é caracterizada pela atuação dos osteoclastos. Na fase de reversão há a remoção dos produtos de degradação do sítio de remodelamento, preparando o leito ósseo para a fase de formação, em que há atuação dos osteoblastos depositando matriz orgânica e mineralizando-a. Adaptado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279149/figure/anat-ultstr-bone-hgr_f_anat-ultstr-bone-hgr_figure6/ (Acesso em 10 de Agosto de 2018) (livro digital ENDOTEXT - De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000)

1.2.2.2 Papel do estrogênio na regulação do remodelamento ósseo

No processo de remodelamento ósseo, os osteoblastos exercem efeito parácrino sobre a diferenciação dos osteoclastos, através da síntese do RANKL, cujo receptor RANK é expresso na superfície dos osteoclastos (RIGSS, 2000; RAGGATT e PARTRIDGE, 2010). Simultaneamente, os osteoblastos também produzem osteoprotegerina (OPG), substância que se liga ao RANKL, neutralizando seu efeito e resultando na inibição da formação e ativação dos osteoclastos (HOFBAUER et al., 2000).

Citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês *Tumor necrosis factor α*), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony stimulating factor*) e prostaglandina E2 (PGE2) também participam da regulação do processo de remodelamento, estimulando a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea (MANOLAGAS, 2002; PACIFICI, 2009).

Uma vez que os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos possuem receptores de estrogênio, esse hormônio exerce modulação sobre as atividades celulares através da regulação de citocinas pro-inflamatórias que atuam na atividade osteoclástica. Dessa forma, o estrogênio estimula a proliferação de osteoblastos e a apoptose dos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea (PACIFICI, 2009). Outros estudos também apontam que o estrogênio exerce regulação positiva sobre o TGF- β , um potente inibidor da reabsorção óssea (ESTAI et al., 2011).

Além disso, o estrogênio exerce efeito inibitório sobre o RANK, sobre o M-CSF e efeito estimulante sobre a OPG, reduzindo ou retardando a reabsorção óssea (SHEVDE et al., 2000). Não há evidências da relação direta do estrogênio com o RANKL (RIGSS, 2000) (**Figura 4**).

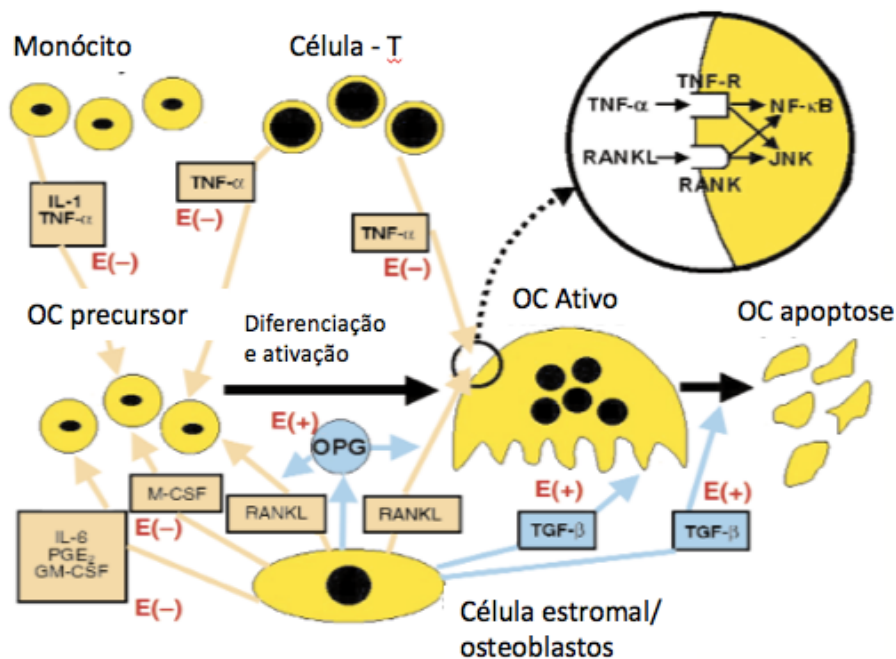


Figura 4. Efeito do estrogênio sobre a regulação da reabsorção óssea. Fatores estimuladores estão representados em laranja e inibitórios em azul. Efeito positivo (+) ou negativo (-) do estrogênio (E) está representado em vermelho. O balão superior mostra as vias de ação do TNF- α e do RANKL através de receptores diferentes, porém ambos sinalizam a via intracelular o receptor ativador do fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *Nuclear Factor κ B*) e cinase c-Jun N-terminal (JNK, do inglês *c-Jun N-terminal kinases*). OC: osteoclasto. OPG: osteoprotegerina. Fonte: Adaptada de Riggs, 2000.

Após a falência ovariana em produzir estrogênio no período pós menopausa, inicia-se um processo de perda da massa óssea, ocasionado pelo aumento do número e função dos osteoclastos, proporcionado pela redução de apoptose dessas células (RIGGS, 2000). Esse processo resulta na redução da massa óssea em mulheres após os 40 anos de idade. Essa redução também é observada em homens, porém com menor intensidade, uma vez que homens acumulam uma maior massa óssea ao longo de sua fase de formação esquelética.

A ausência do estrogênio provoca aumento das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , M-CSF e na redução de OPG. Dessa forma, há aumento na formação de osteoclastos, redução do tempo de vida dos osteoblastos e aumento do tempo de vida dos osteoclastos (**Tabela 1**). Esse processo resulta em acentuada reabsorção óssea, redução da DMO e consequente perda de massa óssea. Além disso, a redução de osteócitos prejudica o mecanismo de detecção de micro lesões no esqueleto, retardando o reparo dos danos (PARK e CHUNG, 2011).

Tabela 1: Alterações celulares e moleculares no microambiente do tecido ósseo na ausência de estrogênio

Alterações Celulares	Osteoblastogênese ↓ (inicial ↑) Osteoclastogênese ↑ Vida útil dos osteoblastos e osteócitos ↓ Vida útil dos osteoclastos ↑
Alterações Moleculares	IL-1, IL-6, M-CSF, TNF ↑ OPG ↓ Interação RANK ligante/RANK ↓

IL: Interleucina, M-CSF: Fator estimulador de colônia de macrófagos, TNF: Fator de necrose tumoral, OPG: Osteoprotegerina, RANK: Receptor do fator ativador NF-Kappa B.

Tabela adaptada de Park; Chung (2011)

1.2.3 Tratamento da Osteoporose

O tratamento da osteoporose envolve além da terapia medicamentosa, mudanças no estilo de vida. Fatores como a prática regular de atividade física, alimentação balanceada, abstenção de tabagismo e etilismo, precaução de queda, ingestão adequada de cálcio e vitamina D são relevantes no tratamento da osteoporose (BACCARO et al., 2015). Além disso, recentemente foi demonstrado que o consumo excessivo de açúcar e bebidas com cafeína esta inversamente correlacionado com a DMO (DE FRANÇA et al., 2016).

Diversas classes de medicamento encontram-se disponíveis no mercado para o tratamento da osteoporose (**Tabela 2**). Entretanto, atualmente, há duas linhas principais: fármacos com ação anti-reabsortiva, que atuam inibindo a ação dos osteoclastos, sendo os bisfosfonatos os mais usados; e os fármacos anabólicos, que atuam promovendo maior atividade dos osteoblastos, sendo a teriparatida, um recombinante análogo ao paratormônio (PTH), a única droga aprovada para uso nos EUA e no Brasil (RADOMINSKI et al., 2017).

Tabela 2: Medicamentos disponíveis no Brasil para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.

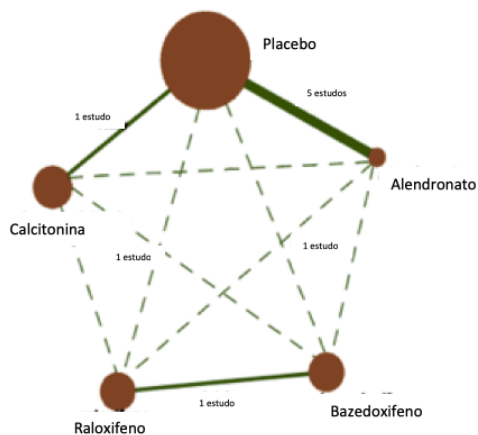
Medicamento	Observações clínicas decorrentes do tratamento
Alendronato	Reduz a incidência de fraturas no quadril e coluna em aproximadamente 50% por 3 anos em pacientes com história prévia de fratura vertebral.
Risedronato	Reduz risco de fratura vertebral em 41 – 49% e fratura não vertebral em 33-39% em pacientes com fraturas prévias.
Ibandronato	Reduz incidência de fratura vertebral em aproximadamente 50% em 3 anos
Pamidronato	Efeito semelhante ao Alendronato em otimizar a DMO
Ácido Zoledrônico	Reduz risco de fratura vertebral em 70%, colo do fêmur em 41% e fraturas não vertebrais em 25%
Raloxifeno	Reduz risco de fratura vertebral em mulheres com osteopenia ou osteoporose entre 30 a 50 %
Calcitonina	Reduz risco de fratura vertebral em 33%, em pacientes sem fratura prévia;
Teriparatida	Reduz incidência de fratura vertebral em 65% e não vertebral em 53%. (Utilizar no maximo por 2 anos)
Denosumab	68% redução de nova fratura vertebral, 20% não vertebral e 40% redução fratura de colo do fêmur
Ranelato de estrôncio	Reduz risco de nova fratura vertebral em 49%, no primeiro ano
Reposição Hormonal com Estrogênio	Reduz risco fratura vertebral e do quadril em 34% ; e outras fraturas em 23%

Fonte: BACCARO et al., (2015).

Os fármacos de primeira linha para o tratamento da osteoporose são os bisfosfonatos (SAAG et al., 2017). Essa classe de medicamento retarda o efeito reabsortivo dos osteoclastos, reduzindo a taxa de remodelamento ósseo e resultando no aumento da DMO (MEUNIER e BOIVIN, 1997).

Recentemente, uma meta-análise incluindo 48.200 pacientes avaliou os principais medicamentos anti-reabsortivos para o tratamento da osteoporose pós-menopausa utilizados por um período mínimo de 12 meses. Dentre os nove medicamentos avaliados (alendronato, risedronato, ibandronato, zoledronato, ranelato de estrôncio, basedroxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno e calcitonina), o alendronato foi o mais eficaz em aumentar a DMO na coluna lombar, colo femoral (**Figura 5A**) e em prevenir fraturas vertebrais por fragilidade óssea (**Figura 5B**). Assim, juntamente com o risendronato, foi indicado como medicamento de escolha (LIU et al., 2017).

A) Alteração da DMO na coluna lombar (%)



B) Novas fraturas vertebrais (%)

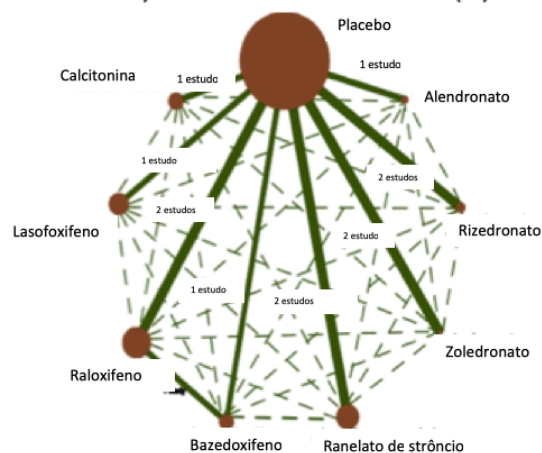


Figura 5. Efeito dos fármacos antiabsortivos sobre a densidade mineral óssea (DMO) (A); e sobre a ocorrência de novas fraturas vertebrais em pacientes osteoporóticos (B). Os diagramas são resultado de metanálise que incluiu 48.200 pacientes osteoporóticos feita a partir de estudos clínicos randomizados. Os círculos representam o percentual de diminuição na DMO (A) e na ocorrência de fraturas vertebrais (B). Adaptada de Liu et al. 2017.

1.2.3.1 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos e do alendronato

O alendronato de sódio é um bisfosfonato que atua como um potente inibidor específico da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Bioquimicamente, é análogo sintético do pirofosfato, um regulador endógeno do remodelamento ósseo que inibe a reabsorção óssea e a mineralização, se ligando à hidroxiapatita do osso (RIGGS e PARFITT, 2005; LIU et al., 2017).

Ao se fixar na área do bordo em escova dos osteoclastos em atividade, inibe a ação de desmineralização óssea enzimática promovida por essa célula. Concentra-se sob os osteoclastos nas cavidades de reabsorção (lacunas reabsortivas de Howship), locais de reabsorção óssea. Estes, sob efeito do medicamento, não apresentam a borda enrugada, indicativa de reabsorção ativa (**Figura 6**) (PAPAPOULOS, 2013).

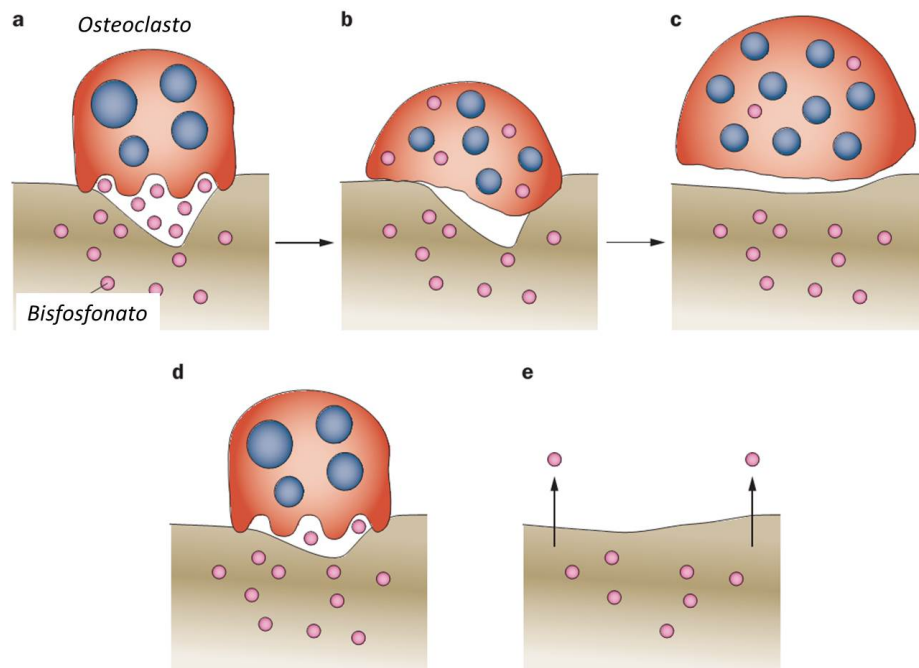


Figura 6. Mecanismo de ação dos bisfosfonatos. (A) Inicialmente, os bisfosfonatos se ligam à matriz óssea e, durante a reabsorção, o osteoclasto fagocita o bisfosfonato; (B) Depois de absorver o bisfosfonato, os osteoclastos sofrem mudanças, incluindo a perda da borda ondulada e tornam-se inativos, impedindo a reabsorção adicional; (C) Eventualmente os osteoclastos podem persistir sobre o osso como grandes células multinucleadas inativadas, enquanto a lacuna reabsortiva é preenchida por osso novo; (D) Após a interrupção do tratamento, os bisfosfonatos ligados à matriz são gradualmente liberados conforme ocorrem os novos ciclos de remodelação óssea. (E) Os bisfosfonatos também podem ser liberados a partir de osso por dessorção, a uma taxa dependente de sua afinidade de ligação. Adaptada de PAPAPOULOS, 2013.

1.2.3.2 Vantagens e desvantagens no uso do alendronato

Os bisfosfonatos reduzem em, pelo menos, 70% o risco de fraturas vertebrais osteoporóticas e, em aproximadamente 20%, fraturas do esqueleto apendicular (EASTELL et al., 2014). Particularmente, o uso do alendronato por 12 meses previne a ocorrência de novas fraturas vertebrais por fragilidade em pacientes com osteoporose instalada e reduz a gravidade das fraturas quando existentes (NOGUÉS e MARTINEZ-LAGUNA, 2017).

Entretanto, o uso crônico desta classe de medicamento está correlacionado à ocorrência de fraturas da diáfise femoral e ao retardo na consolidação óssea (CHAROPOULOS et al., 2011). Esse efeito é resultado da supressão do remodelamento ósseo, que também retarda o reparo das micro lesões continuamente acumuladas no esqueleto, gerando assim fragilidade

óssea (MASHIBA et al., 2005). Em modelo animal murino também foi constatado um efeito prejudicial sobre a fusão vertebral intertransversária. Neste modelo, o alendronato diminuiu a reabsorção do enxerto intervertebral, retardando a fusão vertebral (HUANG et al., 2005).

Uma revisão realizada na Espanha propõe a utilização dos bisfosfonatos por um período determinado, variando de 2 a 10 anos, visando reduzir o potencial efeito de fraturas atípicas relacionadas ao fármaco, porém essa conduta não é um consenso no mundo (NOGUÉS e MARTINEZ-LAGUNA, 2017).

Uma meta-análise avaliou a presença de consolidação precoce e tardia em um total de 2508 pacientes osteoporóticos que utilizaram bisfosfonatos durante o período de consolidação óssea. Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os pacientes que utilizaram ou não o medicamento. Concluíram que o bisfosfonato não exerce efeito prejudicial sobre a consolidação óssea em humanos. Os autores afirmam porém que, em estudos com modelos animais, o efeito prejudicial à consolidação seria relacionado à dose do fármaco, que em humanos seria insuficiente para causar tal efeito deletério (XUE et al., 2014).

Permanece controverso na literatura se o uso crônico de bisfosfonatos, previamente à intervenção cirúrgica, interfere no processo de consolidação óssea, especialmente após a cirurgia de fusão vertebral.

O envelhecimento populacional leva ao aumento da necessidade de procedimentos cirúrgicos ortopédicos e a alta prevalência de osteoporose representa um importante fator de risco para falha da cirurgia. No Brasil, o medicamento recomendado para o tratamento dessa doença é o alendronato, devido a seu baixo custo e eficácia em aumentar a DMO. Entretanto, diversos estudos mostram resultados controversos em relação aos efeitos deste medicamento quando o paciente precisa ser submetido ao procedimento de fusão vertebral. Compreender as consequências do uso crônico do alendronato sobre a massa de fusão em biomodelos submetidos à fusão vertebral torna-se interessante por mimetizar a situação clínica frequentemente observada na prática clínica de cirurgias de coluna vertebral, na qual pacientes que fazem uso contínuo deste medicamento para o tratamento da osteoporose necessitam de uma cirurgia de artrodese na coluna vertebral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar o efeito do uso contínuo (crônico) do alendronato na consolidação óssea do procedimento de fusão vertebral em ratas osteoporóticas.

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer o modelo de osteoporose através de ooforectomia em ratas Sprague Dawley e confirmar a condição osteoporótica por quantificação de carboxitelopectídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I (CTX-I) por ensaio imunoenzimático (ELISA);
2. Avaliar a taxa de fusão através de palpação manual e de radiografias do segmento lombar;
3. Quantificar a formação óssea através da medida do volume ósseo, do número e da espessura das trabéculas ósseas na massa de fusão por microtomografia computadorizada (μ CT);

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (CEUA/INTO) sob o número de protocolo 004/2016 (ANEXO A).

4.2 Desenho Experimental

Foram utilizadas 15 ratas da linhagem Sprague Dawley, com peso corporal de aproximadamente 250g. Os animais foram divididos em três grupos (**Figura 7**). O grupo Não OVX foi constituído por animais submetidos apenas à cirurgia de fusão nas vértebras L4-L5 (n=5). Os demais grupos foram constituídos por 10 ratas submetidas ao procedimento de ooforéctomia, entre 9 a 12 semanas de idade, período este após sua maturidade sexual, que foram submetidas ou não ao tratamento com alendronato, como indicado a seguir: grupo sem tratamento (OVX; n=3) e grupo que recebeu 70µg/kg de alendronato (Fosamax®, Merk Sharp & Dohme, New Jersey, EUA) por via subcutânea uma vez por semana iniciado 5 semanas antes da cirurgia de fusão vertebral e mantido até o fim do experimento, totalizando 12 semanas (ALN; n=7).

A solução de alendronato foi preparada a partir da maceração de um comprimido em solução salina (NaCl 0,9%), conforme estabelecido por (PRICE et al., 2001), e preparado individualmente conforme o peso do animal.

Os animais foram submetidos à eutanásia por exanguinação, sob anestesia inalatória com isoflurano (Biochimico, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil), 8 semanas (final da sétima semana) após o procedimento de fusão vertebral.

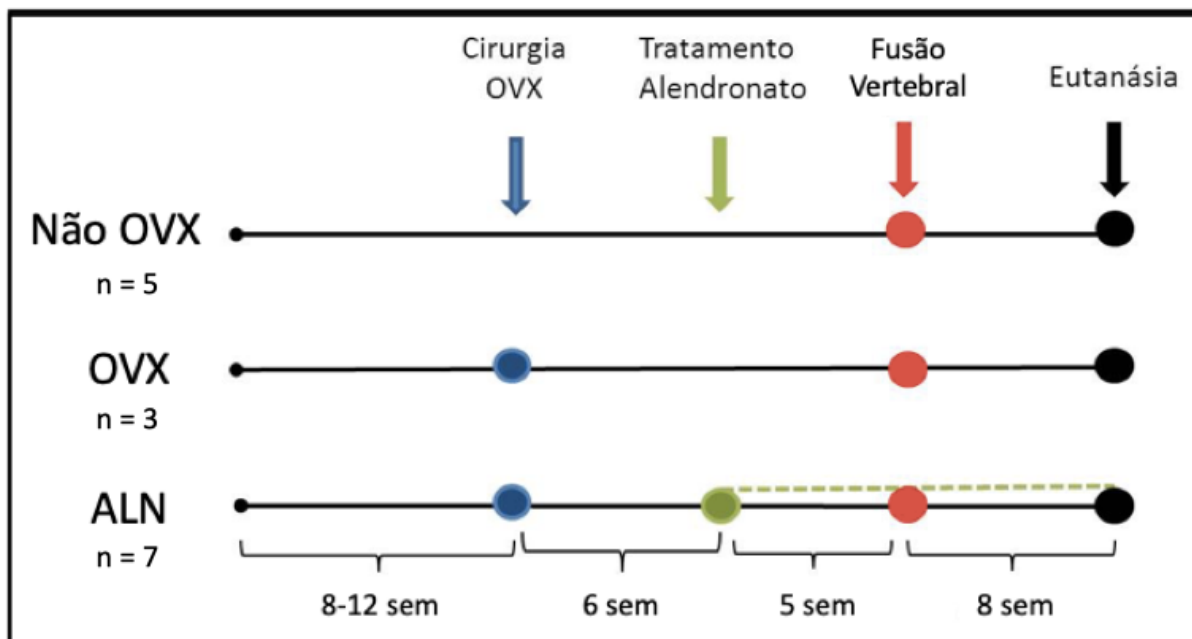


Figura 7. Desenho Experimental do estudo: (**Não OVX**) Ratas não submetidas a ooforectomia e submetidas a fusão vertebral; (**Grupo OVX**) Ratas ooforectomizadas entre 8 -12 semanas de vida, submetidas a fusão vertebral 12 semanas após a ooforectomia; (**Grupo ALN**) Ratas ooforectomizadas entre 8 – 12 semanas de vida, submetidas a fusão vertebral após 12 semanas da ooforectomia, que receberam semanalmente 70µg/kg de alendronato (ALN) iniciado 5 semanas antes da fusão vertebral e mantido até a eutanásia.

4.3 Manutenção dos animais

Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco® basic Monte Mor, São Paulo, Brasil) em biotério de experimentação exclusivo para a espécie. Foram alocados individualmente, em caixas de 30cm x 20cm x 14cm (PxLxA). Foi mantido ciclo de fotoperíodo de 12 horas de luz, seguidas de 12 horas de escuro, com temperatura entre 20°C e 22°C e 50% de umidade relativa. Todos os animais tiveram acesso à água filtrada e ração irradiada *ad libitum* (Nuvilab CR-1®, Nuvital, Curitiba, Paraná, Brasil).

4.4 Técnica cirúrgica

4.4.1 Anestesia

A indução anestésica foi realizada em câmara de indução com concentração alveolar mínima de isoflurano de 5,0% (CAM₅₀) e a manutenção foi realizada com 2,0% através de

máscara facial. Foi utilizado o vaporizador universal (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Durante a anestesia, os seguintes parâmetros foram avaliados: reflexo podal de retirada, tônus muscular e frequência respiratória.

4.4.2 Ooforectomia

A ooforectomia foi realizada entre 9 e 12 semanas de vida, quando os animais já apresentam maturidade sexual (PARK et al., 2010).

Após o plano anestésico, as ratas foram posicionadas em decúbito lateral e foi realizada incisão transversal na pele, de aproximadamente 1,5 cm, entre a última costela e a articulação coxofemoral. A parede muscular subjacente foi ultrapassada por divulsão, com auxílio de tesoura com ponta romba até a exposição da cavidade peritoneal. O ovário encontra-se localizado em meio ao tecido adiposo desta região e, uma vez localizado, foi realizada a ligadura da extremidade da tuba uterina. A retirada do ovário foi realizada por secção entre a região da ligadura e o ovário. Ao final do procedimento, o útero foi recolocado na cavidade abdominal e os planos muscular, subcutâneo e a pele foram suturados com pontos simples. Foram utilizados fio de sutura reabsorvível 6-0 (Vicryl®, Ethicon, Vila Olímpica, São Paulo, Brasil) para a sutura dos tecidos muscular e subcutâneo e fio de *nylon* 6-0 (Nylon® Ethicon, Vila Olímpica, São Paulo, Brasil) para a sutura da pele (**Figura 8**).

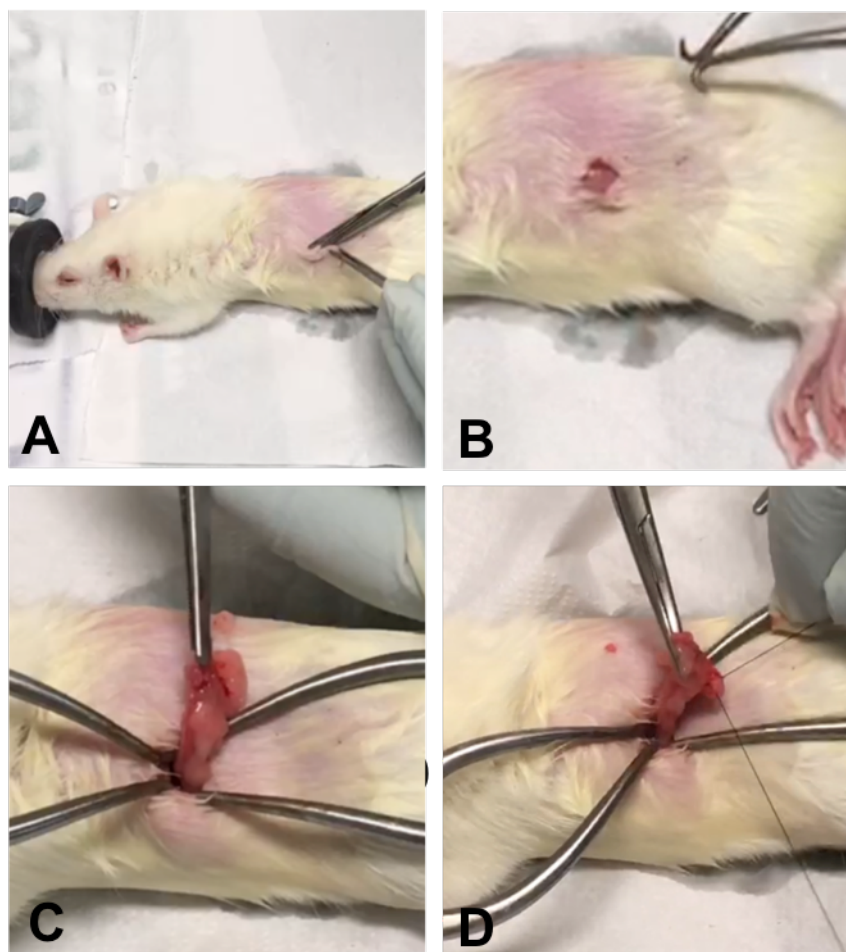


Figura 8. Ooforectomia em ratas. (A) Rata sob anestesia inalatória posicionada para ooforectomia, (B) Acesso, plano subcutâneo e visualização de musculatura; (C) Exposição do ovário e tuba uterina, (D) Ligadura e exérese do ovário.

4.4.3 Fusão pósterio lateral (dorso lateral) da coluna

Após o plano anestésico, foi realizada incisão e exérese do terço distal da cauda, para obtenção do enxerto autólogo seguida, de fechamento da pele com fio de sutura de Nylon 3-0 (Nylon® Ethicon, Vila Olímpica, São Paulo, Brasil). Esse material foi processado sob esterilidade em fluxo laminar. Para tanto, as partes moles foram removidas e obtidas vértebras distais da cauda. Para a obtenção do enxerto, as vértebras foram maceradas com auxílio de uma goiva e o enxerto foi pesado em balança de precisão. O enxerto foi separado em duas alíquotas de 0,15g em microtubos (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) e imediatamente utilizado entre os processos transversos de L4-L5 bilateralmente, totalizando 0,3g / animal (**Figura 9**).

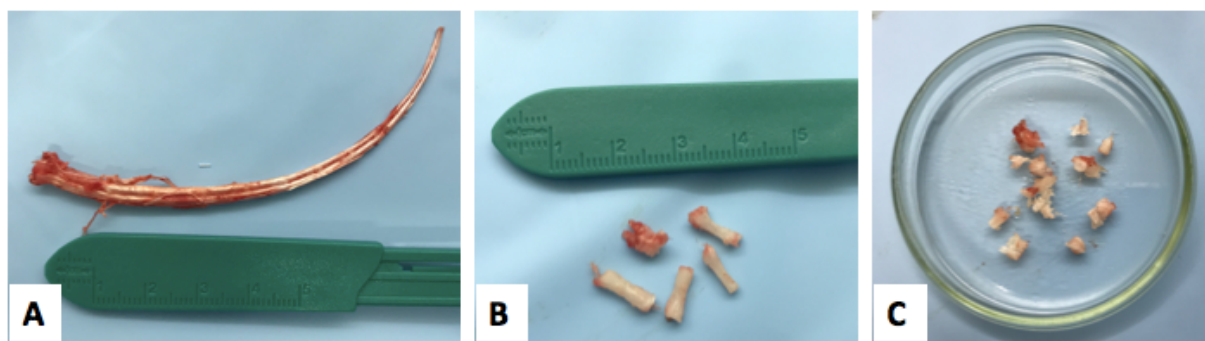


Figura 9. Preparo de enxerto ósseo autólogo extraído da cauda do animal (A) Terço distal da cauda após remoção da pele; (B) Vértébras caudais após exérese de partes moles; (C) Fragmentos macerados e preparados para utilizar como enxerto autólogo.

A cirurgia de fusão foi realizada conforme descrito por KAITO et al., (2013) Após a tricotomia e preparo do local da cirurgia, as ratas foram colocadas em decúbito ventral em uma mesa de operação, sob anestesia inalatória. Uma incisão de 4 cm na linha média foi efetuada ao longo dos processos espinhosos centrada no nível de L4-L5, seguido por duas incisões paramedianas a 1 cm da linha média na fáscia dorsal, a fim de expor os processos transversos. Em seguida, foi realizada a descorticalização dos processos transversos da área de fusão com auxílio de pinça goiva e cureta e os 0,3g de enxerto ósseo foram colocados nesta área cruenta (**Figura 10**). A fáscia muscular foi fechada com uma fio de sutura de Vicryl 3-0 (Vicryl® Ethicon, Vila Olímpica, São Paulo, Brasil) e a pele foi suturada com Nylon 3-0 (KAITO et al., 2013).

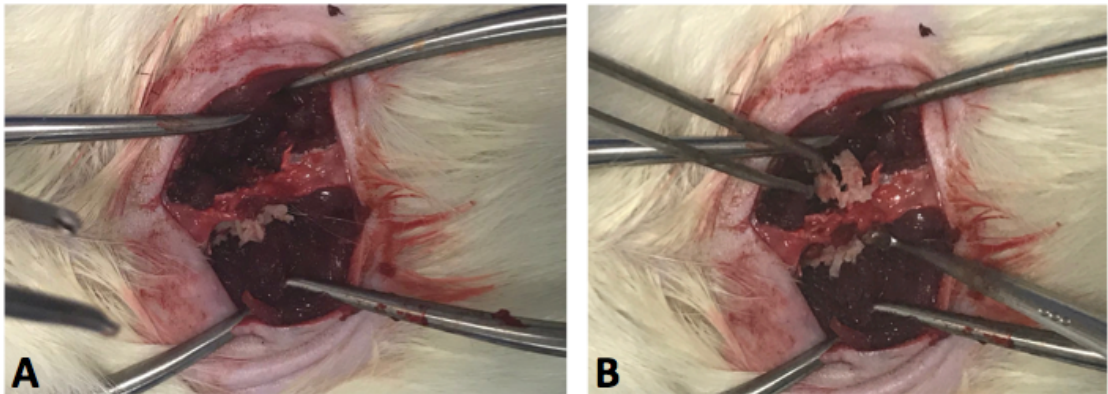


Figura 10. Posicionamento do enxerto ósseo na cirurgia de fusão posterolateral da coluna vertebral. Após a decorticalização dos processos transversos com pinça goiva e cureta (A), 0,15g de enxerto ósseo autólogo foram colocados em cada lado na região paravertebral cruentizada totalizando 0,3g por animal (B).

4.5 Controle da dor e antibioticoterapia

Para o controle da dor em ambos os procedimentos, ooforectomia e fusão vertebral, foi utilizado cetoprofeno (Ketoprofeno 1%, Vencofarma, Londrina PR, Brasil) na dose de 3 mg/kg associado a cloridrato de tramadol (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brasil) na dose de 5 mg/Kg por via subcutânea, uma vez ao dia, durante três dias. Foi realizada antibioticoterapia sistêmica, em todos os animais, com cefazolina sódica (Fazolon®, Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brasil) na dose de 50mg/Kg, por via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante três dias. A primeira dose foi aplicada no período pré-operatório imediato, antes da tricotomia, e as outras doses nos dois dias subsequentes.

No período pós-operatório imediato, o comportamento e a deambulação dos animais foram observados por 20 minutos. Após verificação de comportamento, os animais foram realocados no biotério. Doses de reforço de tramadol foram aplicadas, quando o animal apresentava sinais sugestíveis de dor, que são irritabilidade, agitação motora, movimentos incoordenados.

4.6 Coleta de amostras

Foi realizada coleta de sangue de todos os animais por punção da veia da cauda, uma vez por semana, a partir da cirurgia de fusão vertebral até a eutanásia (8 semanas). Para isso, após anestesia dos animais (seção anestesia), foi feita antissepsia da cauda com álcool 70% e a punção foi realizada com cateter intravenoso 0,7 mm x 19 mm (Insyte™ Autoguard™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Para coleta, o cateter foi rinsado com solução de EDTA a 1,8mg/mL. O sangue foi coletado, misturado a 100µL da solução de EDTA e centrifugado a 3.500 rpm durante 15 minutos. Em seguida o plasma foi coletado e armazenado em duplicata em microtubos e estocado a -70°C.

Oito semanas após a cirurgia de fusão vertebral, foi realizada a eutanásia dos animais por exsanguinação, através de punção cardíaca sob anestesia inalatória. Após constatado o óbito, os animais foram encaminhados para radiografia da coluna e foi então realizada a necropsia para remoção do segmento lombar. Após a dissecação, foi realizada a análise manual da fusão vertebral e, em seguida, o fragmento lombar foi conservado sob refrigeração (2 a 8°C) em solução de etanol a 70%, para posterior avaliação por microtomografia computadorizada (µCT).

4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A quantificação do CTX-I foi realizada por ensaio imunoenzimático com kit espécie-específico (Catálogo: ER0876, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, China). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante e a leitura da absorbância foi realizada em aparelho Polaris (Celer Biotecnologia S.A.). Para este ensaio, foram utilizados o plasma obtido a partir da coleta de sangue de ratas ooforectomizadas (seis semanas após a cirurgia de ooforectomia) e de ratas controle não ooforectomizadas, pareadas em relação a idade.

4.8 Análise radiográfica

A presença da massa de fusão entre L4 e L5 foi avaliada nas imagens radiográficas obtidas no dia da eutanásia. As imagens foram geradas no equipamento Raio-X XR6000 (General Electric Healthcare, Nightingales LN Reino Unido) e analisadas quanto à formação ou não da massa de fusão por dois observadores independentes, considerando os critérios definidos por Lenke et al., 1992 em que: A- há massa de fusão bilateral, B – há massa de fusão unilateral; C – há massa de fusão bilateral pequena e D – não observa-se formação de massa (reabsorção do enxerto). As imagens classificadas como “A” foram consideradas como fusão e aquelas classificadas como “B”, “C”, “D” e “E” consideradas como não fusão (LENKE et al., 1992).

4.9 Avaliação manual da fusão

Os segmentos lombares da coluna foram testados manualmente para avaliação de mobilidade intersegmentar, por três examinadores, de forma cegada e independente. As análises foram realizadas nas peças imediatamente após a necropsia. A ausência de mobilidade entre L4 e L5 foi considerada como sucesso da fusão e a detecção de qualquer movimento entre as facetas ou entre os processos transversais entre estes segmentos foi considerado como fracasso da fusão. Após a avaliação independente pelos três examinadores, foi feito um consenso para definição do resultado final.

4.10 Análise por microtomografia (μ CT)

Após a eutanásia, os segmentos vertebrais L4-L5 foram coletados, fixados e analisados por μ CT *ex vivo*, para a caracterização das propriedades estruturais da massa de fusão. Os ensaios de μ CT foram realizados em colaboração com o pesquisador Kurt Hankenson (Laboratório de Pesquisa Ortopédica, Departamento de Cirurgia Ortopédica, Universidade de Michigan, EUA).

A análise microtomográfica foi realizada no equipamento Bruker SkyScan™ (modelo 1076, Kontick, Bélgica). As amostras foram imersas em água e escaneadas individualmente com os seguintes parâmetros: tamanho de *voxel* de 9µm, tensão de 65KV, corrente de 381µA, parcela de giro de 0.3°, tempo de exposição de 2ms e 2 *frames*. As imagens de cada amostra foram reconstruídas pelo programa NRecon® (Bruker, Kontick, Bélgica) com coeficiente de atenuação 0.005534, *smoothing* 3.0, compensação de desalinhamento de 2.0, correção de artefatos de anéis de 10 e redução de artefato de endurecimento do feixe de 30%.

O programa DataViewer® (Bruker, Kontick, Bélgica) foi utilizado para o realinhamento das imagens e visualização tridimensional e o programa CTan® (Bruker, Kontick, Bélgica) foi utilizado para a análise quantitativa. O valor limiar (*threshold*) inferior e superior para os pixels das imagens foram determinados em 63 e 255, respectivamente. A imagem de uma única seção transversa do segmento lombar em 2D foi utilizada para definir a região de interesse (ROI). A reconstrução em 3D resulta do empilhamento ordenado das ROI's gerando o volume de interesse (VOI). A análise quantitativa da neoformação óssea foi realizada no VOI da seguinte forma:

- 1) Análise quantitativa do corpo vertebral: foi definido um VOI de 4.0mm x 1.0mm x 0.5mm na região central do corpo da vértebra para confirmar a condição osteoporótica;
- 2) Volume total da vértebra: considerado como o VOI completo das vértebras envolvidas no processo de fusão, mais o enxerto e a neoformação óssea do processo transverso.
- 3) Análise da neoformação óssea: Para avaliar as características morfológicas da massa óssea neoformada na fusão foi determinado um VOI de 0.5mm x 0.5mm x 0.1mm exatamente na região de neoformação entre os processos transversos para cada amostra.

4.11 Análises dos dados

Os dados foram apresentados com os valores de média $\pm$ desvio padrão. A análise de distribuição dos dados numéricos foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk e a identificação de valores *outliers* foi realizada pelo teste de ROUT com Q=1%. Para as variáveis com distribuição normal, utilizou-se o teste paramétrico t de Student não pareado para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey's para comparação entre três grupos (compara-se todos os grupos entre si). Quando a distribuição dos dados se mostrou não-normal foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e o teste Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn's para comparação entre três grupos. Os resultados estatisticamente significativos foram aceitos com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prism versão 8.0 (San Diego, California, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento do modelo de osteoporose

Inicialmente, objetivamos caracterizar o modelo de osteoporose induzida por ooforectomia. Para isso, 12 semanas após a cirurgia de remoção dos ovários, os níveis plasmáticos de CTX-I dos animais controles (Não OVX) e dos animais ooforectomizados (OVX) foram quantificados através de ensaio de ELISA (**Figura 11**). A concentração plasmática de CTX-I foi significativamente maior no grupo OVX (1300 ± 133 pg/mL) em relação ao grupo não OVX ($734 \pm 63,6$ pg/mL), $p=0,0086$. Um animal do grupo Não OVX foi excluído da análise, pois a dosagem de CTX (1.675 pg/mL) foi considerada *outlier* pelo teste estatístico de ROUT e este animal (identificação 25) foi excluído de todas as análises posteriores.

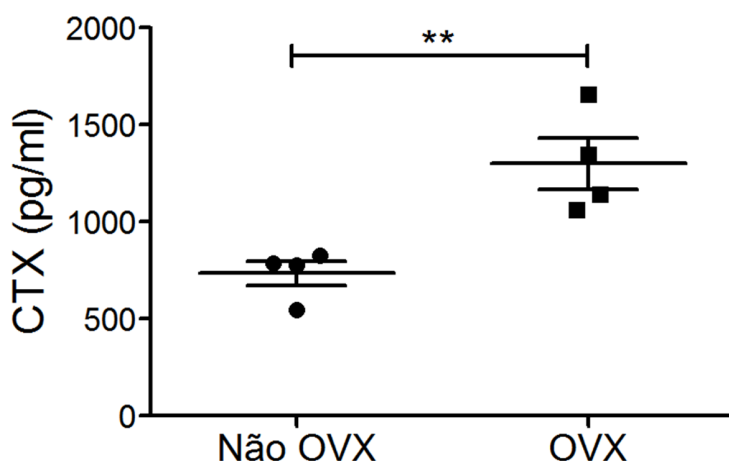


Figura 11. Quantificação dos níveis plasmáticos de carboxitelopectídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I (CTX-I). Plasma coletado por punção da veia caudal 12 semanas após a realização das cirurgias de ooforectomia. O plasma das ratas controle (Não OVX), não submetidas a cirurgia de ooforectomia, também foi obtido. A quantificação de CTX-I foi realizada através de ensaio de ELISA. Não OVX $n=4$, OVX $n=4$, $p=0,0086$. Teste de Mann-Whitney. Dados representativos de média $\pm$ desvio padrão.

Paralelamente, com o intuito de caracterizar melhor as alterações ósseas induzidas pela osteoporose, ao final do experimento, os corpos vertebrais de vértebras lombares, não

submetidos ao procedimento de artrodese, foram analisados por microtomografia quanto às características de sua microarquitetura. Através desta análise, podemos observar que os parâmetros de fração de volume ósseo (BV/TV) e número de trabéculas (Tb.N), encontraram-se ligeiramente reduzidos nos animais osteoporóticos, Não OVX: $13,4 \pm 7,1\%$ vs OVX: $4,6 \pm 3,8\%$ ($p=0,117$) e Não OVX: $1,5 \pm 0,7$ 1/mm vs OVX $0,6 \pm 0,6$ 1/mm ($p=0,228$), respectivamente, porém sem significância estatística. Assim como a separação das trabéculas (Tb.Sp) que foi de $0,3 \pm 0,07$ mm no grupo Não OVX e $0,4 \pm 0,09$ mm no grupo OVX ($p=0,221$). Já a espessura das trabéculas (Tb.Th) apresentou-se significativamente menor no grupo OVX ($0,6 \pm 0,001$ mm) em relação ao grupo Não OVX ($0,08 \pm 0,007$ mm) $p=0,034$. O padrão da estrutura trabecular medido pelo Tb.pf mostra que as trabéculas ficaram mais desconectadas no grupo OVX ($26,9 \pm 5,5$) do que no grupo Não OVX ($15,0 \pm 8,3$) $p = 0,086$ (**Figura 12**).

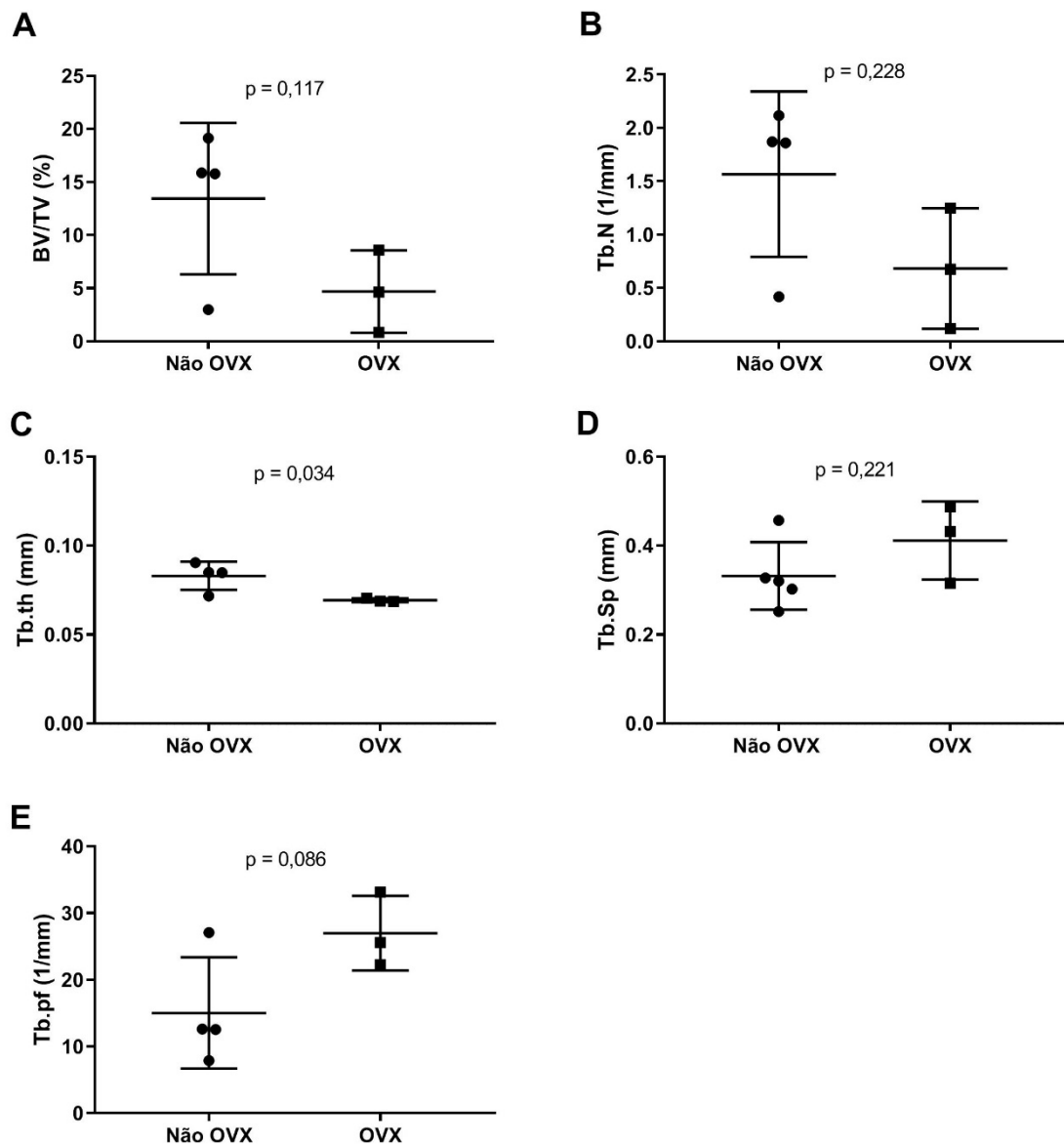


Figura 12. Caracterização da microarquitetura óssea em ratas ooforectomizadas (OVX).

Após a eutanásia dos animais, as vértebras lombares L1 ou L2 dos animais dos grupos Não OVX e OVX foram analisadas por microtomografia quanto a suas características estruturais. Não OVX n=5, OVX n=3. BV/TV: fração de volume óssea, Tb.N: número de trabéculas e Tb.th: espessura de trabéculas, Tb.Sp: separação das trabéculas, Tb.pf: fator de padrão do osso trabecular. Teste T não pareado exceto para o parâmetro Tb.N, em que foi utilizado o teste Mann-Whitney. Dados representativos de média $\pm$ desvio padrão.

5.2 Avaliação do tratamento com alendronato sobre a formação da massa de fusão

5.2.1 Avaliação da fusão

Após a eutanásia, a fusão óssea foi avaliada através da avaliação radiográfica e avaliação manual do segmento lombar. Através da avaliação radiográfica (**Tabela 3**) encontramos que no grupo Não OVX, 60% (3/5) dos animais apresentavam fusão, 100% (3/3) dos animais do grupo OVX apresentavam fusão, enquanto em nenhum (0/7) dos animais do grupo ALN a fusão foi detectada. Pela avaliação manual, para o grupo Não OVX, 75% (3/4) e OVX, 100% (3/3). Contudo, observamos 57,1% (4/7) de fusão no grupo ALN. O mesmo animal do grupo Não OVX que foi excluído das análises de CTX por ter apresentado valor *outlier*, não apresentou fusão. Os dados brutos com a avaliação de cada animal estão disponíveis no Apêndice A.

Tabela 3: Avaliação da fusão segundo avaliação radiográfica e avaliação manual.

Grupo experimental	Avaliação Radiográfica	Avaliação Manual
Não-OVX	3/4 (75%)	3/4 (75%)
OVX	3/3 (100%)	3/3 (100%)
ALN	0/7 (0%)	4/7 (57,1%)

A partir das radiografias obtidas, realizamos uma análise qualitativa da massa de fusão nos três grupos avaliados. Observamos que a massa de fusão dos animais dos grupos Não OVX e OVX apresentaram aspecto organizado, compactado, com poucas espículas ósseas e tamanho mediano. A massa de fusão típica dos animais do grupo ALN, por outro lado, apresentou grande quantidade de espículas ósseas, indicando não reabsorção do enxerto, aspecto desorganizado e descompactado (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

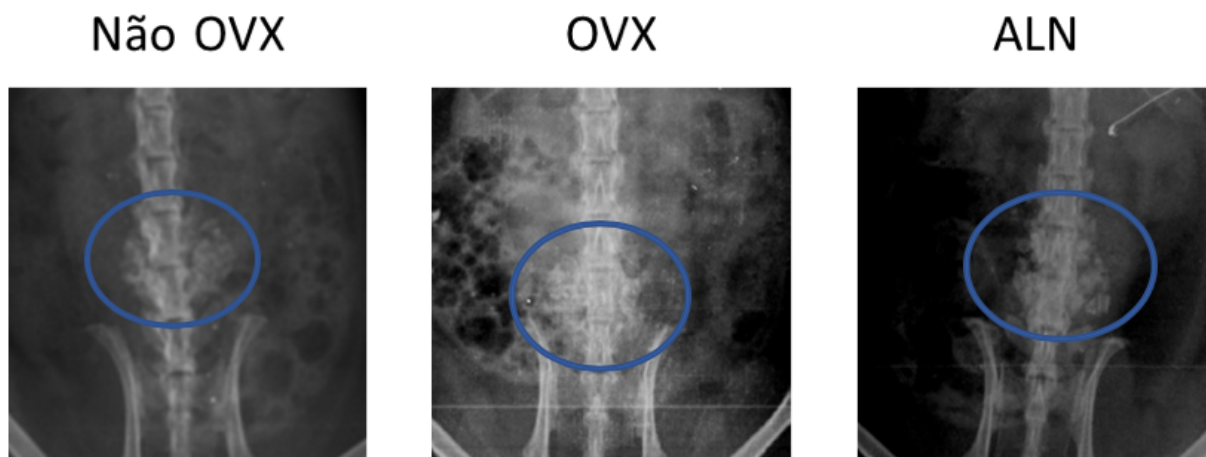


Figura 13. Avaliação Radiográfica. Estão apresentadas uma imagem radiográfica representativa de cada grupo. No grupo Não OVX e OVX, nota-se massa de fusão com aspecto homogêneo e fusão estável. Na imagem do grupo ALN, nota-se grande quantidade de enxerto não absorvido, indicando que a fusão não se concretizou.

5.2.2 Avaliação das propriedades estruturais da massa de fusão por morfometria 3D

Através da análise morfométrica 3D, avaliamos alguns aspectos estruturais da massa de fusão. A partir de uma seção transversal do segmento lombar (**Figura 14A**) foi definido um VOI na região de neoformação entre os processos transversos para a análise quantitativa de neoformação óssea da massa de fusão (**Figura 14B**).

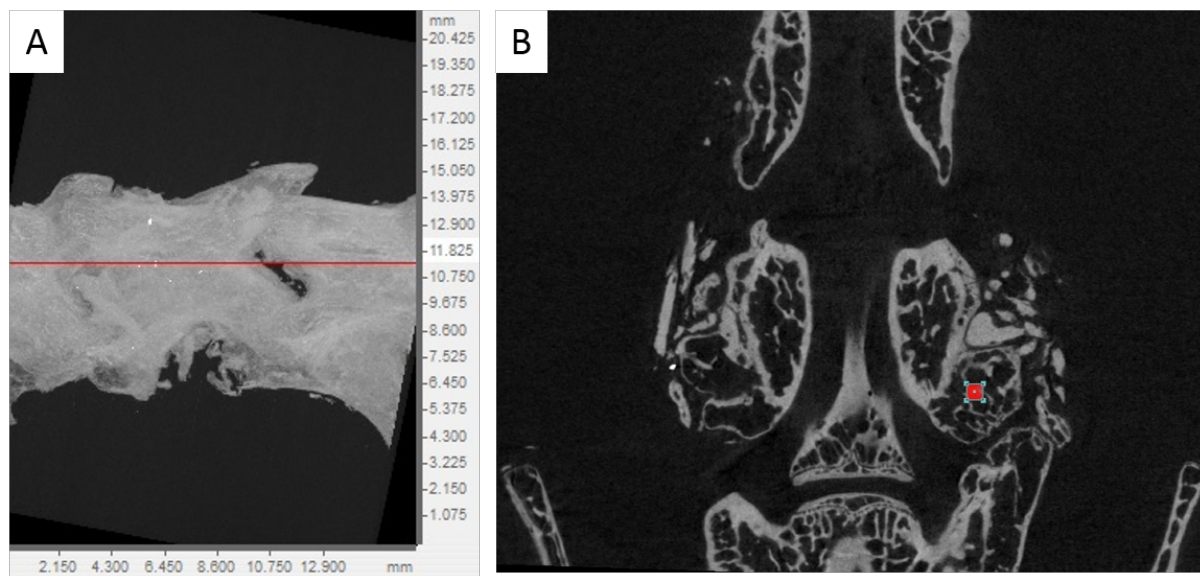


Figura 14. Modelo de avaliação da microarquitetura da massa de fusão. (A) Corte transversal do segmento lombar. (B) Delimitação do volume de interesse (VOI, círculo vermelho) de 0.5mm x 0.5mm x 0.1mm exatamente na região de neoformação entre os processos transversos.

O valor médio de BV/TV foi $22,3 \pm 19,9\%$ para o grupo Não OVX, $5,2 \pm 5,2\%$ para o grupo OVX e $57,9 \pm 20,1\%$ para o grupo ALN, sendo significativamente maior no grupo ALN em relação aos grupos OVX ($p = 0,004$) e Não OVX ($p = 0,025$) (**Figura 15A**).

Em relação ao número de trabéculas (Tb.N), a média do grupo Não OVX foi $2,8 \pm 2,0$ 1/mm, do grupo OVX foi $1,0 \pm 0,8$ 1/mm e do grupo ALN foi $7,1 \pm 1,5$ 1/mm, sendo significativamente maior no grupo ALN em relação ao grupo OVX ($p = 0,0005$) e ao grupo Não OVX ($p = 0,004$) (**Figura 15B**).

A média de espessura das trabéculas (Tb.Th) na massa de fusão foi $0,07 \pm 0,01$ mm para o grupo Não OVX, $0,05 \pm 0,01$ mm para o grupo OVX e $0,08 \pm 0,02$ mm para o grupo ALN, sendo significativamente maior no grupo ALN em relação ao grupo OVX ($p = 0,037$) (**Figura 15C**).

Já para o parâmetro separação trabecular (Tb.Sp), a media dos grupos foi: $0,09 \pm 0,006$ mm para o grupo Não OVX, $0,10 \pm 0,002$ mm para o grupo OVX e $0,07 \pm 0,01$ mm para o

grupo ALN, sendo significativamente menor no grupo ALN em relação aos grupos OVX ($p = 0,001$) e Não OVX ($p = 0,002$)(**Figura 15D**).

A densidade da conectividade da neoformação foi medida pelo parâmetro Conn.Des. Três animais do grupo Não OVX, todos os animais do grupo OVX e um animal do grupo ALN tiveram a quantificação deste parâmetro igual a zero. Os valores médios foram de 37,4; 0,0 e 245,8 $1/\text{mm}^3$ para os grupos: Não OVX, OVX e ALN, respectivamente ($p = 0,02$)(**Figura 15E**).

O padrão da estrutura trabecular (Tb.pf) foi de $35,2 \pm 12,5$; $53,1 \pm 12,4$ e $18,9 \pm 14,1$ $1/\text{mm}$ para os grupos: Não OVX, OVX e ALN, respectivamente. A diferença significativa ($p = 0,034$) entre os grupos OVX e ALN denota que as trabéculas estão mais desconectadas no grupo OVX (**Figura 15F**).

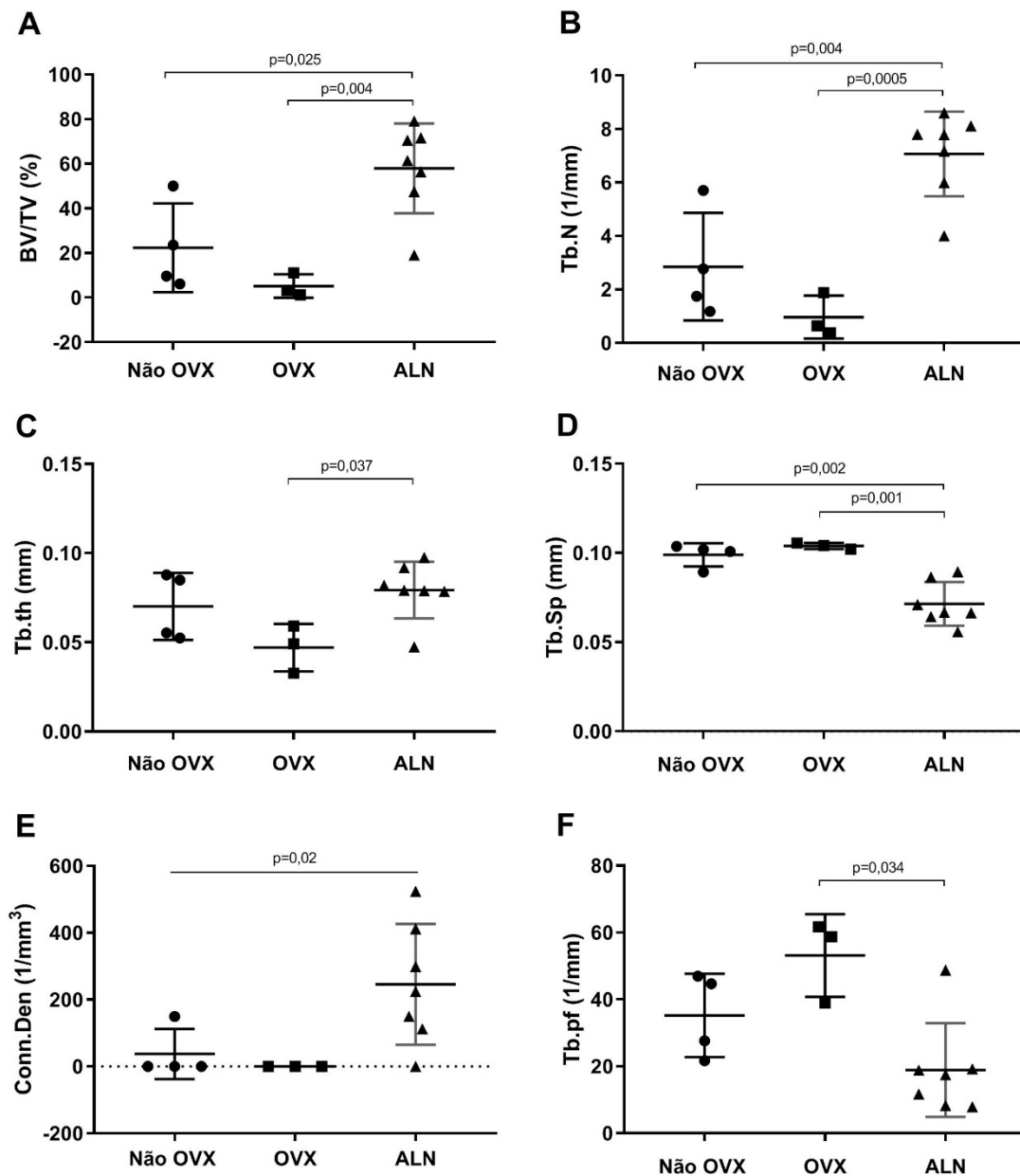


Figura 15. Avaliação da microarquitetura óssea da massa de fusão óssea após fusão vertebral. Após a eutanásia, o segmento lombar dos animais foi coletado, fixado e analisado por microtomografia quanto a suas características estruturais. Animais não submetidos ao procedimento de ooforectomia (Não OVX n=4), Animais submetidos ao procedimento de ooforectomia (OVX n= 3), Animais submetidos ao procedimento de ooforectomia e tratados com alendronato (ALN n=7). BV/TV: fração de volume ósseo, Tb.N: número de trabéculas, Tb.th: espessura de trabéculas e Tb.Sp: separação trabecular. Análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey's para os parâmetros BV/TV, Tb.N, Tb.th, Tb.Sp. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn's para os parâmetros Conn.Den. e Tb.pf. Dados representativos de média $\pm$ desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

O aumento mundial da expectativa de vida alterou o perfil dos indivíduos submetidos a procedimentos cirúrgicos ortopédicos, sendo cada vez mais frequente a realização de cirurgias deste tipo em pacientes idosos, os quais buscam procedimentos específicos para o tratamento de doenças ósteoarticulares degenerativas, com o objetivo de melhorar sua qualidade de vida (BURGE et al., 2007).

Nestes pacientes idosos, a osteoporose é uma condição bastante prevalente e, na população brasileira, o uso de bisfosfonatos é a primeira linha de tratamento, sendo o alendronato de sódio o seu principal representante (RADOMINSKI et al., 2017). Essa classe de medicamentos tem ação antirreabsortiva, reduzindo o número e a função dos osteoclastos, células responsáveis pela degradação do tecido ósseo; alcançando assim a redução da perda de massa óssea (LIU et al., 2017; NOGUÉS e MARTINEZ-LAGUNA, 2017). Contudo, apesar da eficácia e segurança dessa classe de medicamentos em prevenir e reduzir o número de fraturas em idosos, o seu efeito sobre o reparo e a neoformação óssea ainda é controverso na literatura (PARK; CHUNG, 2011; FISCHER et al., 2016, XUE et al., 2014; LIU et al., 2018).

Diversos modelos animais já foram empregados para estudar, em detalhes, o efeito do alendronato sobre a massa de fusão, entretanto, até onde pudemos avaliar, em todos estes estudos, o tratamento com alendronato foi iniciado imediatamente após a cirurgia de fusão (LEHMAN et al., 2004; HUANG et al., 2005; TAKAHATA et al., 2008). É importante ressaltar, contudo, que tal cenário não mimetiza a condição clínica comumente observada que é a de pacientes em tratamento contínuo para osteoporose, e que, portanto, já estão em uso crônico deste medicamento quando submetidos à cirurgia de fusão.

Nesse contexto, para estudar o processo de fusão vertebral, utilizamos um modelo de ratas osteoporóticas em uso crônico de alendronato, objetivando mimetizar a condição clínica

de pacientes osteoporóticos, que utilizam o alendronato para o tratamento da osteoporose e que, eventualmente, venham a ser submetidos a cirurgia de fusão vertebral (ZOU et al., 2008). Determinar o efeito do alendronato sobre a massa de fusão, nesta condição, pode auxiliar na determinação da conduta, ainda controversa, de manutenção ou suspensão do alendronato no período pós-operatório da cirurgia de fusão vertebral, assim como pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que venham a estimular a formação óssea nessa condição (PARK e CHUNG, 2011; LEHMAN et al., 2015).

Em nosso estudo, optamos por utilizar o modelo de osteoporose induzida por ooforectomia, por este modelo ser amplamente utilizado para estudar eventos associados a osteoporose pós menopausa (KITAZAWA et al., 1994; NAKAO et al., 2011; CHO et al., 2012; YOON et al., 2012; MORIMOTO et al., 2015). Dessa forma, poderíamos reproduzir, em biomodelos, a principal causa de osteoporose encontrada em nossa população. Para que o modelo fosse o mais semelhante possível à condição observada em seres humanos, realizamos as cirurgias de ooforectomia em ratas entre 8 e 12 semanas de vida pelo fato de, nesta idade, os animais já apresentarem maturidade esquelética (KALU, 1991). Para caracterizar a indução do estado osteoporótico, realizamos a dosagem de CTX-I no plasma dos animais e observamos que os animais ooforectomizados apresentaram aumento nos níveis deste marcador. O CTX é um marcador específico da reabsorção óssea e diversos estudos usam este marcador para caracterização do estado osteoporótico em modelos animais (HERRMANN e SEIBEL, 2008). Yoon e colaboradores (2012) encontraram resultados semelhantes aos nossos, ao realizarem a quantificação de CTX no plasma de animais submetidos ou não à ooforectomia, oito semanas após a cirurgia e também relataram aumento nos níveis deste marcador nos animais ooforectomizados (YOON et al., 2012).

Para avaliar se as alterações plasmáticas do marcador de reabsorção óssea eram acompanhadas de alterações na microarquitetura óssea, nós avaliamos, por microtomografia

(μ CT), a qualidade óssea dos animais submetidos ou não a ooforectomia. Para esta análise, avaliamos a microarquitetura do corpo vertebral da vértebra L4, uma vez que diversos estudos apontam que, neste modelo, alterações na densidade óssea vertebral já podem ser vistas a partir de 60 dias após a cirurgia de remoção dos ovários (LELOVAS et al., 2008).

Nesta análise, observamos que tanto a fração de volume ósseo, quanto o número de trabéculas encontravam-se reduzidos nos animais ooforectomizados, redução de 66% e 57%, respectivamente; ainda que o resultado não tenha sido estatisticamente significativo. Acreditamos que o número reduzido de animais por grupo e a grande variabilidade destas medidas tenham contribuído para a falta de significância estatística do estudo.

Contudo acreditamos que a castração tenha, de fato, levado ao fenômeno biológico esperado, de redução da qualidade óssea nestes animais. Quando analisamos a espessura de trabéculas, encontramos uma redução significativa nos animais osteoporóticos, com consequente e leve aumento da separação das trabéculas e significativo aumento do fator de desconexão entre as mesmas.

Importante ressaltar que, devido ao desenho experimental e a uma limitação no número de animais, esta análise foi realizada ao final do experimento, 20 semanas após a cirurgia de ooforectomia. Diversos estudos, entretanto, evidenciam que, neste modelo, as alterações ósseas já podem ser observadas a partir de 6 semanas após a cirurgia de remoção dos ovários (BARON et al., 1984; YAMAZAKI e YAMAGUCHI, 1989; JEE e YAO, 2001; PARK et al., 2010). Yoon e colaboradores (2012) utilizaram o mesmo modelo de ooforectomia bilateral para estudar as alterações ósseas induzidas pela castração em ratas e, oito semanas após a cirurgia, já relataram redução significativa na fração de volume ósseo e espessura de trabéculas, redução de 9,1% e 15%, respectivamente; não sendo observada redução significativa no número de trabéculas (YOON et al., 2012). Portanto, esses resultados, conjuntamente, indicam que houve indução do estado osteoporótico nos animais ooforectomizados.

Em relação à avaliação do efeito do alendronato na formação da massa de fusão, tanto os resultados da avaliação manual da fusão quanto a avaliação radiográfica evidenciaram que o uso crônico deste medicamento leva a uma redução na taxa de fusão, tanto em relação ao grupo controle quanto em relação ao grupo osteoporótico que não recebeu alendronato. Os resultados da análise microtomográfica apontaram, contudo, um aumento do volume e da qualidade da massa de fusão vertebral no grupo tratado com alendronato. Provavelmente esse efeito se deve à inibição da atividade dos osteoclastos induzida por este fármaco (GOMES et al., 2017). Outros estudos também relataram que o tratamento com alendronato leva a formação de massas de fusão maiores e mais densas, mas não associaram tal efeito a uma maior eficiência, seja na consolidação de fraturas ou na fusão vertebral (TAKAHATA et al., 2008; ISHIDA et al., 2016).

Huang e colaboradores encontraram resultados semelhantes aos nossos, ao demonstrarem, também em modelo de ratas osteoporóticas, que o alendronato proporcionou um aumento na densidade da massa de fusão devido a redução da reabsorção do enxerto ósseo, porém prejudicando a integração desse enxerto, reduzindo a estabilidade da massa de fusão (HUANG et al., 2005). De forma semelhante, Takahata e colaboradores realizaram um estudo semelhante ao nosso, utilizando ratas ooforectomizadas, para indução de um modelo osteoporótico, seguido por fusão vertebral lombar. Observaram que o alendronato inibiu a ossificação endocondral na massa de fusão e induziu o desenvolvimento de uma massa de fusão mais volumosa e mais densa, em relação ao grupo que não utilizou bisfosfonatos; devido a potente inibição da atividade dos osteoclastos (TAKAHATA et al., 2008).

Nakao et al., 2011, contudo, relataram resultados divergentes. Em seu estudo, foi avaliado o efeito do alendronato sobre a massa de fusão vertebral de ratas ooforectomizadas. Os animais receberam bisfosfonato por 8 semanas após a cirurgia. A área avaliada por microtomografia apresentava-se maior e mais densa, sendo observado, por avaliação

histológica, maior quantidade de osso neoformado e inibição significativa de osteoclastos na área da massa de fusão das ratas que receberam o medicamento. Entretanto, diferentemente do observado em nosso estudo, foi relatado que o grupo de animais osteoporóticos tratados com alendronato apresentou taxa de fusão maior que a do grupo placebo de animais osteoporóticos (NAKAO et al., 2011).

Diversos fatores podem contribuir para os diferentes resultados encontrados. O primeiro deles, pode ser devido ao fato de o tratamento com o alendronato ter sido iniciado em momentos distintos, uma vez que nosso estudo foi o único em que o tratamento foi iniciado no período pré operatório. Uma limitação do nosso estudo foi o fato de as análises microtomográficas terem sido realizadas apenas ao final do experimento, não sendo possível avaliar a qualidade óssea dos animais, incluindo das vértebras, no momento da cirurgia de fusão vertebral. Tal análise é importante, uma vez que o tratamento com alendronato foi iniciado cinco semanas antes da cirurgia de fusão vertebral, e, como já relatado em outros estudos, pode ter alterado a qualidade óssea dos animais tratados (GOMES et al., 2017). Dessa forma, podemos afirmar que a melhoria na qualidade da massa óssea, observada nos animais tratados com alendronato, se dá pelo efeito deste medicamento no processo de formação da massa de fusão. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que estes animais tivessem uma massa óssea de melhor qualidade que a dos animais osteoporóticos quando submetidos ao procedimento de artrodese e que isto tenha contribuído para a melhor qualidade da massa de fusão nestes animais.

Outro fator importante a ser considerado é a fonte e a quantidade de enxerto utilizada, uma vez que é descrito que a quantidade de enxerto ósseo apostado no leito de fusão vertebral é diretamente proporcional à taxa de consolidação da artrodese, devido às propriedades osteo-indutora, condutora e osteogênica do auto enxerto (ZOU et al., 2008). Uma revisão sistemática da literatura com meta-análise apontou que o auto enxerto da cauda foi significativamente associado à melhora na taxa de fusão. Na mesma metanálise, os autores ainda avaliaram que

os estudos envolvendo fusão vertebral em ratas osteoporóticas utilizam entre 0,1 a 2g de enxerto ósseo, no entanto, aponta que a quantidade do enxerto não influencia significativamente no desfecho da fusão (ISHIDA et al., 2016). Em nosso estudo, optamos por utilizar uma quantidade padronizada de 0,15g de enxerto em cada leito de artrodese, valor próximo do limite inferior da média apresentada na literatura, quantidade similar à relatada nos estudos que, assim como o nosso, encontraram que o alendronato prejudica o processo de formação da massa de fusão vertebral. Já no estudo de Nakao e colaboradores (2011), que encontrou que o alendronato aumenta a fusão vertebral de ratas osteoporóticas, a quantidade enxerto utilizada foi o dobro da usada em nosso estudo, de 0,3g em cada leito ósseo (NAKAO et al., 2011).

7 CONCLUSÃO

Concluimos, diante destas diferenças, que o tratamento crônico com alendronato, assim como o tratamento iniciado após a cirurgia, leva à formação de massas de fusão mais exuberantes, porém, diferente do observado quando o tratamento é iniciado após a cirurgia, não resulta em aumento na taxa de fusão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, T.; CHRISTENSEN, F. B.; LANGDAHL, B. L.; ERNST, C.; FRUENSGAARD, S.; ØSTERGAARD, J.; ANDERSEN, J. L.; RASMUSSEN, S.; NIEDERMANN, B.; HØY, K.; HELMIG, P.; HOLM, R.; LINDBLAD, B. E.; HANSEN, E. S.; EGUND, N.; BÜNGER, C. Fusion mass bone quality after uninstrumented spinal fusion in older patients. **European Spine Journal**, v. 19, n. 12, p. 2200–2208, 2010.
- BACCARO, L. F.; CONDE, D. M.; COSTA-PAIVA, L.; PINTO-NETO, A. M. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: A viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583–591, 2015.
- BARON, R.; TROSS, R.; VIGNERY, A. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: Morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. **The Anatomical Record**, v. 208, n. 1, p. 137–145, 1984.
- BECKER, S.; CHAVANNE, A.; SPITALER, R.; KROPIK, K.; AIGNER, N.; OGON, M.; REDL, H. Assessment of different screw augmentation techniques and screw designs in osteoporotic spines. **European Spine Journal**, v. 17, n. 11, p. 1462–1469, 2008.
- BERJANO, P.; LAMARTINA, C. Classification of degenerative segment disease in adults with deformity of the lumbar or thoracolumbar spine. **European Spine Journal**, v. 23, n. 9, p. 1815–1824, 2014.
- BISCHOFF-FERRARI, H. A.; WILLETT, W. C.; WONG, J. B.; GIOVANNUCCI, E.; DIETRICH, T.; DAWSON-HUGHES, B. Fracture Prevention With Vitamin D Supplementation. **Jama**, v. 293, n. 18, p. 2257, 2005.
- BONDE, M.; QVIST, P.; FLEDELIUS, C.; RIIS, B. J.; CHRISTIANSEN, C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 11 I, p. 2022–2025, 1994.
- BOONEN, S.; VANDERSCHUEREN, D.; HAENTJENS, P.; LIPS, P. Calcium and vitamin D in the prevention and treatment of osteoporosis - A clinical update. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 6, p. 539–552, 2006.
- BUREAU, U. S. C.; US CENSUS BUREAU. The Next Four Decades The older Population in the united states : 2010 to 2050. **Statistics**, v. 2011, n. May, p. 3–14, 2010.
- BURGE, R.; DAWSON-HUGHES, B.; SOLOMON, D. H.; WONG, J. B.; KING, A.; TOSTESON, A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 3, p. 465–475, 2007.
- CANNISTRA, A. F.; PETERSON, Ñ. M. D.; PARKER, S. R.; ROUSH, T. F.; BUNDY, J. V.; TURNER, A. W. MIS Expandable Interbody Spacers. **Spine**, v. 41, n. 8, 2016.
- CHAROPOULOS, I.; ORME, S.; GIANNOUDIS, P. V. Fracture risk associated with chronic use of bisphosphonates: evidence today. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 10, n. 1, p. 67–76, 2011.

- CHIN, D. K.; PARK, J. Y.; YOON, Y. S.; KUH, S. U.; JIN, B. H.; KIM, K. S.; CHO, Y. E. Prevalence of osteoporosis in patients requiring spine surgery: Incidence and significance of osteoporosis in spine disease. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 9, p. 1219–1224, 2007.
- CHO, J. H.; CHO, D. C.; YU, S. H.; JEON, Y. H.; SUNG, J. K.; KIM, K. T. Effect of dietary calcium on spinal bone fusion in an ovariectomized rat model. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 52, n. 4, p. 281–287, 2012.
- CHUN, D. S.; BAKER, K. C.; HSU, W. K. Lumbar pseudarthrosis: a review of current diagnosis and treatment. **Neurosurgery Focus**, v. 39, n. October, p. 1–8, 2015.
- COSMAN, F.; DE BEUR, S. J.; LEBOFF, M. S.; LEWIECKI, E. M.; TANNER, B.; RANDALL, S.; LINDSAY, R. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, 2014.
- DALL, T. M.; GALLO, P. D.; CHAKRABARTI, R.; WEST, T.; SEMILLA, A. P.; STORM, M. V. The care span: An aging population and growing disease burden will require a large and specialized health care workforce by 2025. **Health Affairs**, v. 32, n. 11, p. 2013–2020, 2013.
- DE FRANÇA, N. A. G.; CAMARGO, M. B. R.; LAZARETTI-CASTRO, M.; PETERS, B. S. E.; MARTINI, L. A. Dietary patterns and bone mineral density in Brazilian postmenopausal women with osteoporosis: a cross-sectional study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 85–90, 2016.
- DEAL, C. L. Osteoporosis: prevention, diagnosis, and management. **The American Journal of Medicine**, v. 102, n. 1a, p. 35s–39s, 1997.
- DRESPE, I. H.; POLZHOFFER, G. K.; TURNER, A. S.; GRAUER, J. N. Animal models for spinal fusion. **Spine Journal**, v. 5, n. 6 SUPPL., p. S209–S216, 2005.
- EASTELL, R.; NAGASE, S.; SMALL, M.; BOONEN, S.; SPECTOR, T.; OHYAMA, M.; KUWAYAMA, T.; DEACON, S. Effect of ONO-5334 on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporosis: 2-Year results from the OCEAN study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 2, p. 458–466, 2014.
- ESTAI, M. A.; SUHAIMI, F.; DAS, S.; SHUID, A. N.; MOHAMED, Z.; SOELAIMAN, I.-N. Expression of TGF- β 1 in the blood during fracture repair in an estrogen-deficient rat model. **Clinics**, v. 66, n. 12, p. 2113–2119, 2011.
- FEHLINGS, M. G.; TETREAULT, L.; NATER, A.; CHOMA, T.; HARROP, J.; MROZ, T.; SANTAGUIDA, C.; SMITH, J. S. The aging of the global population: The changing epidemiology of disease and spinal disorders. **Neurosurgery**, v. 77, n. 4, p. S1–S5, 2015.
- FRIEDLY, J.; STANDAERT, C.; CHAN, L. Epidemiology of Spine Care: The Back Pain Dilemma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 21, n. 4, p. 659–677, 2010.
- FRITZELL, P.; HÄGG, O.; NORDWALL, A. Complications in lumbar fusion surgery for chronic low back pain: comparison of three surgical techniques used in a prospective randomized study. A report from the Swedish Lumbar Spine Study Group. **European Spine Journal**, v. 12, n. 2, p. 178–189, 2003.

GALI, J. C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 3–12, 2001.

GOMES, C. C.; FREITAS, D. Q.; MEDEIROS ARAÚJO, A. M.; RAMÍREZ-SOTELO, L. R.; YAMAMOTO-SILVA, F. P.; DE FREITAS SILVA, B. S.; DE MELO TÁVORA, D.; ALMEIDA, S. M. Effect of Alendronate on Bone Microarchitecture in Irradiated Rats With Osteoporosis: Micro-CT and Histomorphometric Analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. December, p. 1–10, 2017.

GRAZIO, S.; CVIJETIĆ, S.; VLAK, T.; GRUBIŠIĆ, F.; MATIJEVIĆ, V.; NEMČIĆ, T.; PUNDA, M.; KUSIĆ, Z. Osteoporosis in psoriatic arthritis: Is there any? **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 123, n. 23–24, p. 743–750, 2011.

GUTIERREZ, M. R.; GONZALEZ, M. F.; VILLAR PEREZ, J.; PEREZ VARELA, L.; PASCUA, L. H.; ALIA BENITEZ, J.; IGNACIO, E. D.; CRUZ, J. J. Q.; ZUNIGA GOMEZ, L.; IZQUIERDO NUNEZ, E. Utilización De Un Nuevo Tornillo Expansivo En Pacientes Con Mala Calidad Ósea. Estudio Multicéntrico. **Coluna/ Columna**, v. 12, n. 4, p. 312–314, 2013.

HAUSER, M.; SIEGRIST, M.; KELLER, I.; HOFSTETTER, W. Healing of fractures in osteoporotic bones in mice treated with bisphosphonates – A transcriptome analysis. **Bone**, v. 112, n. April, p. 107–119, 2018.

HERRMANN, M.; SEIBEL, M. J. Corrigendum to “The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review”. **Clinica Chimica Acta**, v. 397, n. 1–2, p. 57–75, 2008.

HIRSCH, B. P.; UNNANUNTANA, A.; CUNNINGHAM, M. E.; LANE, J. M. The effect of therapies for osteoporosis on spine fusion: A systematic review. **Spine Journal**, v. 13, n. 2, p. 190–199, 2013.

HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L.; BOYLE, W. J.; RIGGS, B. L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 1, p. 2–12, 2000.

HUANG, R. C.; KHAN, S. N.; SANDHU, H. S.; METZL, J. A.; CAMMISA, F. P.; ZHENG, F.; SAMA, A. A.; LANE, J. M. Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. **Spine**, v. 30, n. 22, p. 2516–2522, 2005.

ISHIDA, W.; ELDER, B. D.; HOLMES, C.; LO, S.-F. L.; WITHAM, T. F. Variables Affecting Fusion Rates in the Rat Posterolateral Spinal Fusion Model with Autogenic / Allogenic Bone Grafts : A Meta-analysis. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 44, n. 11, p. 3186–3201, 2016.

JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 3, p. 193–207, 2001.

KAITO, T.; JOHNSON, J.; ELLERMAN, J.; TIAN, H.; AYDOGAN, M.; CHATSRINOPKUN, M.; NGO, S.; CHOI, C.; WANG, J. C. Synergistic Effect of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 7 by ex Vivo Gene Therapy in a Rat Spinal Fusion Model. **The journal of bone and joint surgery, Incorporated**, v. 95, p. 1612–1619, 2013.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and**

Mineral, v. 15, n. 3, p. 175–191, 1991.

KAMATH, M. S.; AHMED, S. S. S. J.; DHANASEKARAN, M.; SANTOSH, S. W. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. **International journal of nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 183–95, 2014.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J. J.; OURSLER, M. J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 421–428, 2008.

KITAZAWA, R.; KIMBLE, R. B.; VANNICE, J. L.; KUNG, V. T.; PACIFICI, R. Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 6, p. 2397–406, 1994.

LEHMAN, R. A.; KANG, D. G.; WAGNER, S. C. Management of osteoporosis in spine surgery. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 23, n. 4, p. 253–263, 2015.

LEHMAN, R. A.; KUKLO, T. R.; FREEDMAN, B. A.; COWART, J. R.; MENSE, M. G.; RIEW, K. D. The effect of alendronate sodium on spinal fusion: A rabbit model. **Spine Journal**, v. 4, n. 1, p. 36–43, 2004.

LELOVAS, P. P.; XANTHOS, T. T.; THOMA, S. E.; LYRITIS, G. P.; DONTAS, I. A. Strengths and limitations of rat models of osteoporosis. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 5, p. 424–430, 2008.

LENKE, L. G.; BRIDWELL, K. H.; BULLIS, D.; BETZ, R. R.; BALDUS, C.; SCHOENECKER, P. L. Results Of In Situ Fusion For Isthmic Spondylolisthesis. **Journal of spinal disorders**, v. 5 N.4, p. 433–442, 1992.

LIU, G.-F.; WANG, Z.-Q.; LIU, L.; ZHANG, B.-T.; MIAO, Y.-Y.; YU, S.-N. A Network Meta-Analysis on the Short-Term Efficacy and Adverse Events of Different Anti-Osteoporosis Drugs for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. **Journal of cellular biochemistry**, n. December, 2017.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells : Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 115–137, 2002.

MARINHO, B. C. G.; GUERRA, L. P.; DRUMMOND, J. B.; SILVA, B. C.; SOARES, M. M. S. The burden of osteoporosis in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 434–443, 2014.

MARTINI, L. A.; MOURA, E. C. de; SANTOS, L. C. dos; MALTA, D. C.; PINHEIRO, M. de M. Prevalência de diagnóstico auto-referido de osteoporose, Brasil, 2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. suppl 2, p. 107–116, 2009.

MASHIBA, T.; MORI, S.; KOMATSUBARA, S.; CAO, Y.; MANABE, T.; NORIMATSU, H.; BURR, D. B. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. SUPPL. 1, p. 36–42, 2005.

MEUNIER, P. J.; BOIVIN, G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: Therapeutic implications. **Bone**, v. 21, n. 5, p. 373–377, 1997.

MIRANDA, D.; MORAIS, G.; MENDES, G.; CRUZ, A.; SILVA, A.; LUCIA, A. O envelhecimento populacional brasileiro : desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 3, p. 507–19, 2016.

MOBBS, R. J.; PHAN, K.; MALHAM, G.; SEEX, K.; RAO, P. J. Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF, OLIF/ATP, LLIF and ALIF. **Journal of Spine Surgery**, v. 1, n. 1, p. 2–18, 2015.

MORIMOTO, T.; KAITO, T.; MATSUO, Y.; SUGIURA, T.; KASHII, M.; MAKINO, T.; IWASAKI, M.; YOSHIKAWA, H. The bone morphogenetic protein-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration than the individual homodimers in a rat spinal fusion model. **Spine Journal**, v. 15, n. 6, p. 1379–1390, 2015.

MUMMANENI, P. V; HADDOCK, S. M.; LIEBSCHNER, M. a K.; KEAVENY, T. M.; ROSENBERG, W. S. Biomechanical evaluation of a double-threaded pedicle screw in elderly vertebrae. **Journal of spinal disorders & techniques**, v. 15, n. 1, p. 64–68, 2002.

NAKAO, S.; MINAMIDE, A.; KAWAKAMI, M.; YOSHIDA, M. The Influence of Alendronate on Spine Fusion in an Osteoporotic Animal Model. **Spine**, v. 36, n. 18, p. 1446–1452, 2011.

NOGUÉS, X.; MARTINEZ-LAGUNA, D. Tratamiento de la osteoporosis. **Medicina Clínica**, v. 150, n. 12, p. 479–486, 2017.

OHTORI, S.; INOUE, G.; ORITA, S.; YAMAUCHI, K.; EGUCHI, Y.; OCHIAI, N.; KISHIDA, S.; KUNIYOSHI, K.; AOKI, Y.; NAKAMURA, J.; ISHIKAWA, T.; MIYAGI, M.; KAMODA, H.; SUZUKI, M.; KUBOTA, G.; SAKUMA, Y.; OIKAWA, Y.; INAGE, K.; SAINOH, T.; TAKASO, M.; TOYONE, T.; TAKAHASHI, K. Comparison of teriparatide and bisphosphonate treatment to reduce pedicle screw loosening after lumbar spinal fusion surgery in postmenopausal women with osteoporosis from a bone quality perspective. **Spine**, v. 38, n. 8, p. 487–492, 2013.

PACIFICI, R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 8, p. 1043–1051, 2009.

PAPAPOULOS, S. E. Bone diseases: Bisphosphonates in osteoporosis - Beyond 5 years. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 5, p. 263–264, 2013.

PARK, S. B.; CHUNG, C. K. Strategies of spinal fusion on osteoporotic spine. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 49, n. 6, p. 317–322, 2011.

PARK, S. B.; LEE, Y. J.; CHUNG, C. K. Bone Mineral Density Changes after Ovariectomy in Rats as an Osteopenic Model : Stepwise Description of Double Dorso-Lateral Approach. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 48, p. 309–312, 2010.

PATRICK, N.; EMANSKI, E.; KNAUB, M. A. Acute and chronic low back pain. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 4, p. 777–789, 2014.

PEARSON, R. G.; CLEMENT, R. G. E.; EDWARDS, K. L.; SCAMMELL, B. E. Do

smokers have greater risk of delayed and non-union after fracture, osteotomy and arthrodesis? A systematic review with meta-analysis. **BMJ Open**, v. 6, n. 11, 2016.

PINHEIRO, M. M.; SCHUCH, N. J.; GENARO, P. S.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B.; MARTINI, L. A. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2009.

POLIKEIT, A.; NOLTE, L. P.; FERGUSON, S. J. The effect of cement augmentation on the load transfer in an osteoporotic functional spinal unit: Finite-element analysis. **Spine**, v. 28, n. 10, p. 991–996, 2003.

PRICE, P. A.; FAUS, S. A.; WILLIAMSON, M. K. Inhibit Bone Resorption. **Bone And Mineral**, p. 817–824, 2001.

RADOMINSKI, S. C.; BERNARDO, W.; PAULA, A. P. de; ALBERGARIA, B.-H.; MOREIRA, C.; FERNANDES, C. E.; CASTRO, C. H. M.; ZERBINI, C. A. de F.; DOMICIANO, D. S.; MENDONÇA, L. M. C.; POMPEI, L. de M.; BEZERRA, M. C.; LOURES, M. A. R.; WENDER, M. C. O.; LAZARETTI-CASTRO, M.; PEREIRA, R. M. R.; MAEDA, S. S.; SZENJENFELD, V. L.; BORBA, V. Z. C. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 7, n. S 2, p. 452–466, 2017.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

REGINSTER, J. Y.; BURLET, N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. **Bone**, v. 38, n. 2 SUPPL. 1, p. 1998–2003, 2006.

RIGGS, B. L.; PARFITT, A. M. Drugs used to treat osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 2, p. 177–184, 2005.

RIGGS, B. L. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 10, p. 1203–1204, 2000.

SAAG, K. G.; PETERSEN, J.; BRANDI, M. L.; KARAPLIS, A. C.; LORENTZON, M.; THOMAS, T.; MADDUX, J.; FAN, M.; MEISNER, P. D.; GRAUER, A. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 15, p. 1417–1427, 2017.

SARZIER, J. S.; EVANS, A. J.; CAHILL, D. W. Increased pedicle screw pullout strength with vertebroplasty augmentation in osteoporotic spines. **Journal of neurosurgery**, v. 96, n. 3 Suppl, p. 309–12, 2002.

SHEVDE, N. K.; BENDIXEN, a C.; DIENGER, K. M.; PIKE, J. W. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 7829–7834, 2000.

SI, L.; WINZENBERG, T. M.; JIANG, Q.; CHEN, M.; PALMER, A. J. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010–2050. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 7, p. 1929–1937, 2015.

SILVA, F. E.; LENKE, L. G. Adult degenerative scoliosis: evaluation and management. **Neurosurgical Focus**, v. 28, n. 3, p. E1, 2010.

SMITH, J. S.; AMES, C. P. The SRS-Schwab Adult Spinal Deformity Classification. **Neurosurgery**, v. 73, p. 559–568, 2013.

STONE, A.; STONE, M. A.; JAKOI, A. M.; IORIO, J. A.; PHAM, M. H.; PATEL, N. N.; HSIEH, P. C.; LIU, J. C.; ACOSTA, F. L.; HAH, R.; WANG, J. C. Bisphosphonate ' s and Intermittent Parathyroid Hormone ' s Effect on Human Spinal Fusion : A Systematic Review of the Literature. p. 484–493, 2017.

SZULC, P.; BOUXSEIN, M. Overview of osteoporosis: Epidemiology and clinical management. **Vertebral Fracture Initiative**, p. 1–65, 2011.

TAKAHATA, M.; ITO, M.; ABE, Y.; ABUMI, K.; MINAMI, A. The effect of anti-resorptive therapies on bone graft healing in an ovariectomized rat spinal arthrodesis model. **Bone**, v. 43, n. 6, p. 1057–1066, 2008.

TOMÉ-BERMEJO, F.; PIÑERA, A. R.; ALVAREZ-GALOVICH, L. Osteoporosis and the management of spinal degenerative disease (I). **Archives of Bone and Joint Surgery**, v. 5, n. 5, p. 363–374, 2017.

TU, C. W.; HUANG, K. F.; HSU, H. T.; LI, H. Y.; YANG, S. S. D.; CHEN, Y. C. Zoledronic acid infusion for lumbar interbody fusion in osteoporosis. **Journal of Surgical Research**, v. 192, n. 1, p. 112–116, 2014.

WEINSTEIN, J. N.; LURIE, J. D.; OLSON, P.; BRONNER, K.; FISHER, E. S.; MORGAN, T. S. United States Trends and Regional Variations in Lumbar Spine Surgery: 1992–2003. **Spine**, v. 31, n. 23, p. 2707–2714, 2006.

XUE, D.; LI, F.; CHEN, G.; YAN, S.; PAN, Z. Do bisphosphonates affect bone healing? A meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

YAMAZAKI, I.; YAMAGUCHI, H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 1, p. 13–22, 1989.

YANG, H.; HALDEMAN, S.; LU, M.-L.; BAKER, D. Low Back Pain Prevalence and Related Workplace Psychosocial Risk Factors: A Study Using Data From the 2010 National Health Interview Survey. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 39, n. 7, p. 459–472, 2017.

YOON, K.; CHO, D.; YU, S.; KIM, K.; PH, D.; JEON, Y.; PH, D. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats : Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 51, p. 323–327, 2012.

ZOU, L.; ZOU, X.; LI, H.; XUE, Q.; BUNGER, C. The Influence of Bone Graft Volume and Alendronate Treatment on Spine Fusion. **Orthopaedic Surgery Spine**, p. 69–71, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/INTO)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA DO INTO

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeito da Teriparatida em ratas osteoporóticas em tratamento com bisfosfonatos" protocolado sob o número 004/2016, utilizando 50 (cinquenta) ratas Sprague Dawley, sob a responsabilidade do pesquisador Cleiton Dias Naves, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e foi aprovado na segunda reunião da Comissão em 26 de outubro de 2016.

(We certify that the research " Teriparatide effect on spinal fusion in osteoporotic rats under bisphosphonates treatment", protocol number 004/2016, utilizing 50 (fifty) Sprague Dawley rats, under the responsibility of the researcher Cleiton Dias Naves, agree with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethic Commission on Animal Use of the National Institute of Traumatology and Orthopedics, and was approved at the first meeting of the Commission on October 26, 2016).

Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2016.

Assinatura: _____

Diego Pinheiro Aguiar

Coordenador da Comissão

APÊNDICE

APÊNDICE A – Dados brutos da análise de fusão. O animal 25 foi excluído das análises.

Grupo	ID	Fusão Palpação manual	Fusão análise Raio-X
CONTROLE	25	NÃO	B
CONTROLE	26	SIM	A
CONTROLE	27	PARCIAL	D
CONTROLE	28	SIM	A
CONTROLE	29	SIM	A
OVX	3	SIM	A
OVX	8	SIM	A
OVX	18	SIM	A
OVX + ALENDRONATO	1	SIM	B
OVX + ALENDRONATO	6	SIM	C
OVX + ALENDRONATO	10	SIM	B
OVX + ALENDRONATO	15	NÃO	D
OVX + ALENDRONATO	17	PARCIAL	B
OVX + ALENDRONATO	21	PARCIAL	C
OVX + ALENDRONATO	22	SIM	B