



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpm1@sbpc.org.br, adagmar.andriolo@gmail.com

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Bergmann de Carvalho, Ana Carolina; Nara Henriques, Helene; Soares Pantaleão, José Augusto; Pollastri, Carlos Eduardo; Vicentis de Oliveira Fernandes, Gustavo; Granjeiro, José Mauro; Guzmán-Silva, Maria Angélica

Histomorfometria do tecido ósseo em ratas castradas tratadas com tibolona  
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 46, núm. 3, junho, 2010, pp. 235-243

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial  
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541954010>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Histomorfometria do tecido ósseo em ratas castradas tratadas com tibolona

Primeira submissão em 14/05/09  
Última submissão em 24/02/10  
Aceito para publicação em 30/03/10  
Publicado em 20/06/10

## Bone tissue histomorphometry in castrated rats treated with tibolone

Ana Carolina Bergmann de Carvalho<sup>1</sup>; Helene Nara Henriques<sup>2</sup>; José Augusto Soares Pantaleão<sup>3</sup>; Carlos Eduardo Pollastri<sup>4</sup>; Gustavo Vicentis de Oliveira Fernandes<sup>5</sup>; José Mauro Granjeiro<sup>6</sup>; Maria Angélica Guzmán-Silva<sup>7</sup>

| unitermos | resumo  |
|-----------|---|
| Tibolona  | <p><b>Introdução e objetivo:</b> O efeito da tibolona utilizada em alta dose e por tempo prolongado foi analisado mediante estudo histomorfométrico de tíbias e fêmures de ratas castradas. <b>Métodos:</b> O experimento utilizou 20 ratas Wistar, com peso médio de 250 g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: ooforectomizado recebendo tibolona (OVX + T) (<math>n = 9</math>), ooforectomizado (OVX) (<math>n = 6</math>) e grupo controle não ooforectomizado (C) (<math>n = 5</math>). Deu-se início ao protocolo experimental 30 dias após a ooforectomia, perdurando por 20 semanas, com administração de tibolona (1 mg/dia) a OVX + T e carboximetilcelulose a OVX. O grupo C não foi submetido a qualquer tratamento. Tíbias e fêmures direitos foram fixados em formol a 10% tamponado, descalcificados e processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados mediante hematoxilina-eosina para análise histomorfométrica. Mediram-se a espessura cortical e a cavidade medular em cortes transversais de tíbia e fêmur e percentual de porosidade e densidade trabecular em cortes longitudinais de fêmur. <b>Resultados e discussão:</b> Não houve diferença estatística entre OVX e OVX + T nas diversas análises. Os resultados demonstram que a tibolona não melhorou de forma significativa a qualidade óssea, porém preservou a massa óssea cortical, nas diáfises femoral e tibial, e o osso trabecular, nos côneos femorais. O uso prolongado de tibolona em concomitância com alta dose pode ter influenciado tais efeitos, já que estudos recentes têm preconizado a utilização de doses mais baixas na prevenção da osteoporose. <b>Conclusão:</b> A ooforectomia ocasionou perda óssea nas regiões analisadas; a tibolona, apesar de não ter aumentado a massa óssea, manteve-a em níveis satisfatórios.</p> |
| Menopausa |   |
| Osso      |   |
| Ratas     |   |

| abstract  | key words  |
|---|--|
| <p><b>Introduction and objective:</b> The effect of tibolone administered in high dose over a prolonged period was analyzed through histomorphometry of tibia and femur samples from castrated rats. <b>Methods:</b> The experiment was performed in 20 Wistar rats with average weight of 250 g. The animals were randomly divided into three groups: oophorectomized receiving tibolone (OVX + T) (<math>n = 9</math>), oophorectomized (OVX) (<math>n = 6</math>) and non-oophorectomized as control group (C) (<math>n = 5</math>). The experimental protocol was initiated 30 days after oophorectomy and lasted 20 weeks. Tibolone (1 mg/day) was administered to OVX + T rats and carboxymethyl cellulose to OVX. C rats did not go through any treatment. Right side tibias and femurs were fixed in 10% buffered formalin, decalcified and embedded in paraffin. Histological sections were stained by hematoxylin-eosin for histomorphometric analysis. The cortical thickness and medullary cavity were measured in transverse tibia and femur sections. The percentage of porosity and the trabecular density were determined in longitudinal femur sections. <b>Results and discussion:</b> There was no significant statistical difference between OVX and OVX + T in several analyses. The results showed that tibolone did not improve bone quality significantly, although it preserved cortical bone mass in femoral and tibial diaphyses and the trabecular bone in femoral condyles. The administration of tibolone in high dose for a prolonged period may have influenced these effects inasmuch as recent studies have recommended the use of lower doses in osteoporosis prevention. <b>Conclusion:</b> Oophorectomy caused bone loss in the analyzed regions. Despite the fact tibolone did not augment bone mass, this was kept at satisfactory levels.</p> | <p><b>Tibolone</b></p> <p><b>Menopause</b></p> <p><b>Bone</b></p> <p><b>Rats</b></p> |

1. Doutoranda em Ciências Médicas pela Universidade Federal Fluminense (UFF); mestra em Patologia Investigativa pela UFF.

2. Doutoranda em Patologia Geral pela UFF; mestra em Patologia Investigativa pela UFF.

3. Doutor em Patologia Investigativa pela UFF; professor associado do Departamento Materno Infantil da UFF.

4. Doutor em Patologia Investigativa pela UFF; professor adjunto do Departamento Materno Infantil da UFF.

5. Mestrando em Ciências Médicas pela UFF.

6. Doutor em Química pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); professor associado do Departamento de Biologia Celular e Molecular da UFF.

7. Doutora em Patologia Experimental pela UFF; professora associada do Departamento de Patologia da UFF.

## Introdução

Avanços obtidos com pesquisas e descobertas de novos tratamentos na área da saúde estão propiciando cada vez mais um aumento na expectativa de vida de mulheres e homens, crescendo, assim, o número de pessoas com idade superior a 65 anos, que muitas vezes apresentam alterações oriundas da senescência, como é o caso da osteoporose. Todo esse avanço desencadeou crescente interesse pelas questões relacionadas ao envelhecimento feminino<sup>(2, 15)</sup>. Mulheres na pós-menopausa apresentam alto risco de fraturas por perda óssea decorrentes da deficiência estrogênica por perda da função ovariana natural nessa fase da vida<sup>(2, 31)</sup>.

O climatério pode ser considerado o período de encerramento da vida reprodutiva da mulher, quando ocorrem falta da ovulação, deficiência da secreção de hormônios esteroidais e uma série de mudanças regressivas dos caracteres femininos. Clinicamente, é uma etapa marcante no envelhecimento feminino, caracterizada pelo estágio fisiológico de hipoestrogenismo e por perda gradual e progressiva da função ovariana, resultando na interrupção definitiva dos ciclos menstruais<sup>(15, 44)</sup>.

Um problema de saúde que ocorre durante a menopausa é a osteoporose, definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura, com consequente aumento da fragilidade óssea e maior suscetibilidade a fraturas<sup>(3, 9-11, 24)</sup>. As vértebras, os ossos do quadril e os dos punhos são os mais comumente fraturados<sup>(9)</sup>.

Os esteroides sexuais têm papel primordial na manutenção da homeostasia óssea, prevenindo e tratando a osteoporose<sup>(4, 11, 41)</sup>. Nas várias opções terapêuticas para a pós-menopausa, a tibolona, um esteroide sintético 19-nor derivado do noretinodrel, estruturalmente diferente do estradiol e dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), é considerada uma opção de grande valor, sendo um composto de ação tecidual específica com efeitos favoráveis em diversos órgãos, sem estimulação dos tecidos mamário e endometrial<sup>(22, 27, 39, 42, 45)</sup>. Possui ação específica para os tecidos, distinguindo-se das terapêuticas hormonais de substituição (THS) convencionais. A tibolona possui ações seletivas tanto estrogênicas quanto progestogênicas e androgênicas<sup>(12, 25, 28, 31, 38)</sup>.

A identificação dos fatores de risco e a determinação da massa óssea são fundamentais para a saúde do osso. Deve-se prevenir o processo acelerado de perda óssea e tratar a osteoporose antes que ocorram danos estruturais irreversíveis. Estudos utilizando modelos de ratas

ooforectomizadas confirmaram o efeito estrogênico direto da tibolona no osso, diminuindo a reabsorção e mantendo a qualidade óssea cortical e trabecular<sup>(14, 28, 31)</sup>. Porém, outros estudos têm recomendado que se tenha especial cuidado em casos de uso excessivo deste fármaco, o que pode comprometer a competência biomecânica do material ósseo<sup>(18)</sup>.

A incidência de casos de osteoporose tem aumentado nas últimas décadas devido a um aumento da expectativa de vida. As consequentes fraturas vêm causando significativas morbidade e mortalidade, além de altos custos aos cofres públicos<sup>(41)</sup>. Por isso a detecção precoce de perda óssea é muito importante para que sejam estabelecidas estratégias terapêuticas efetivas, objetivando a prevenção das temidas fraturas<sup>(8, 14, 43)</sup>.

A histomorfometria óssea é um dos métodos convencionais para avaliação da microarquitetura óssea trabecular<sup>(29)</sup>, permitindo qualificar e quantificar de forma segura as estruturas ósseas<sup>(3)</sup>. Portanto, desempenha importante papel no estudo de determinados distúrbios metabólicos e seus tratamentos.

Recentemente têm-se demonstrado que a redução na espessura das trabéculas ósseas, juntamente com o grau de perfuração do osso e consequente desarranjo de sua microarquitetura, é responsável pela menor capacidade do osso em suportar cargas, uma vez que nem sempre uma boa quantidade de massa óssea (volume trabecular normal) significa uma boa resistência (conectividade normal). Esse fato explica a presença de fraturas em indivíduos com massa óssea normal. Dessa forma, as técnicas histomorfométricas têm sido aperfeiçoadas visando analisar parâmetros que informem sobre a conectividade e a microarquitetura do tecido, atuando como importante ferramenta de auxílio ao diagnóstico da osteoporose<sup>(3)</sup>.

Todos os aspectos descritos até então serão analisados neste estudo, que tem por objetivo verificar o efeito do uso prolongado de alta dose de tibolona no tecido ósseo de ratas castradas.

## Material e métodos

### Animais

O experimento foi realizado em 20 ratas Wistar com 8 semanas de idade e peso médio de 250 g. Todas foram obtidas do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNE) do Departamento de Nutrição e Dietética da Universidade Federal Fluminense (UFF) e mantidas nesse biotério durante a experimentação. Os animais foram alojados em gaiolas

individuais de polipropileno e fundo com leite de maravalha esterilizada. Os mesmos receberam água filtrada e ração para ratos<sup>(36)</sup> fornecida *ad libitum* durante todo o experimento. A pesquisa foi realizada de acordo com as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) da UFF.

### Protocolo experimental

Quinze ratas foram ooforectomizadas sob anestesia intramuscular<sup>(33)</sup> com 100 mg/kg de quetamina e 20 mg/kg de xilazina. Essas ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: ooforectomizado + tibolona (OVX + T), com nove animais, e ooforectomizado (OVX), com seis animais. As outras cinco ratas não ooforectomizadas constituíram o grupo controle (C), usado apenas como parâmetro de normalidade óssea. O tratamento hormonal começou 30 dias após a ooforectomia e perdurou por 20 semanas. A tibolona foi dissolvida a 0,2% em solução de CMC a 0,5%, sendo administrada diariamente num volume de 0,5 ml por intubação esofágica, o que representa 1 mg/rata. O grupo OVX recebeu apenas 0,5 ml de solução de CMC a 0,5%. A cada 30 dias era coletada citologia vaginal de todas as ratas para verificar a evolução do *status* hormonal. Após o tratamento as ratas foram anestesiadas conforme prévia descrição e mortas mediante deslocamento cervical. Tíbias e fêmures direitos foram isolados e dissecados.

### Histomorfometria

Os ossos foram clivados transversalmente na região medial e as metades inferiores foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5,5% em solução de formol a 10%, por um período de duas a três semanas, testando a descalcificação a cada dois a três dias, quando a solução era trocada. A seguir os ossos foram processados para inclusão em parafina e posterior análise microscópica em cortes histológicos de 6 µm corados com hematoxilina e eosina (HE).

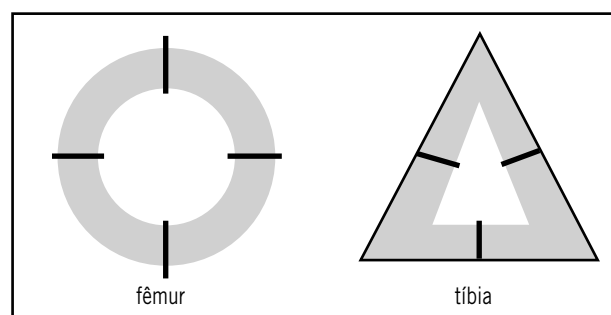
Para análise foram selecionadas as regiões medular e cortical nos cortes transversais das tíbias e fêmures e, ainda, os côndilos femorais em corte longitudinal. As imagens foram capturadas com resolução de 300 dpi mediante máquina fotográfica digital Evolution MP Color 5.0 (Media Cybernetics) acoplada a um microscópio de luz Eclipse E400 (Nikon); as imagens foram gravadas em formato TIFF e avaliadas no programa de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.

### Espessura da cortical (µm) em corte transversal

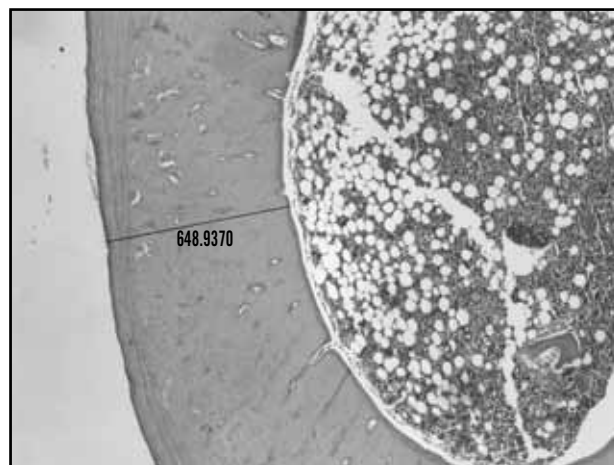
Para o estudo do osso compacto foram utilizados cortes transversais das diáfises da tíbia e do fêmur de cada animal. Nesses cortes, a espessura do osso cortical foi analisada por meio da aquisição de imagens da parte medial das diáfises com aumento final de 40× (ocular de 10× e objetiva de 4×). Foram efetuadas três e quatro medições em cada corte histológico, respectivamente em tíbia e fêmur, priorizando as regiões superior, inferior e lateral de cada corte (**Figura 1**). Para determinar a espessura, o osso cortical foi medido desde a superfície periosteal até a superfície endosteal utilizando-se o programa Image-Pro Plus adequadamente calibrado (**Figura 2**). A partir daí foi calculada a espessura média da cortical para cada osso.

### Área da cavidade medular (mm<sup>2</sup>) em corte transversal

A área da cavidade medular dos ossos foi delineada e medida automaticamente pelo sistema de análise de imagens Image-Pro Plus, previamente calibrado, e com as funções determinadas por uma macro específica. Esta foi



**Figura 1** – Esquema da medição da espessura cortical em fêmur e tíbia. As linhas pretas representam as medições



**Figura 2** – Medição da espessura cortical em fêmur sob final de 40X. A linha representa uma medição (valor em µm)

aplicada às imagens da parte medial das diáfises de tíbia e fêmur, obtidas sob aumento final de 40x (**Figura 3**).

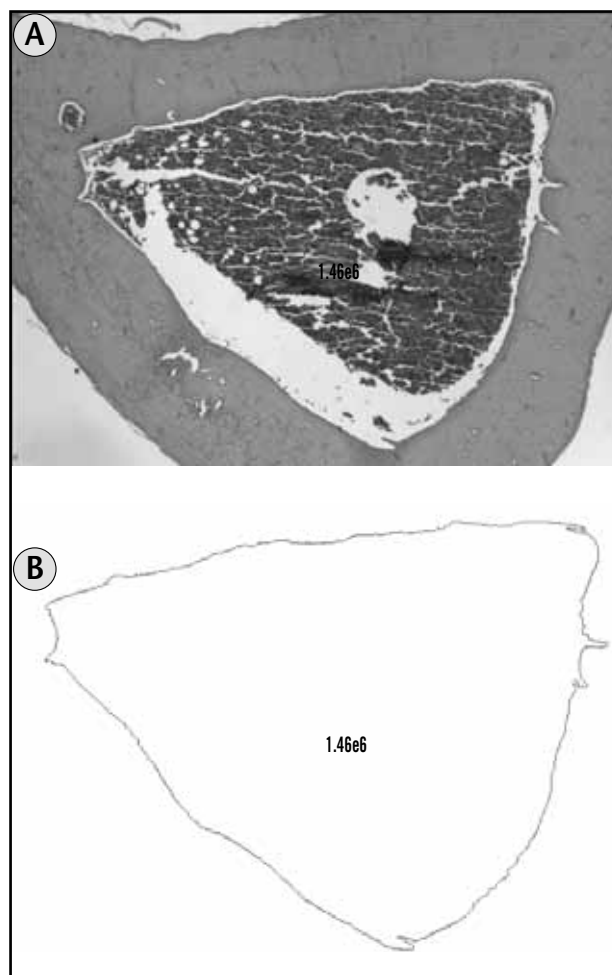
### Densidade (%) dos componentes epifisários dos côneilos femorais por área tecidual

Para a avaliação quantitativa dos componentes epifisários utilizou-se ocular de 10x e objetiva de 2x, totalizando um aumento final de 20x. As contagens foram realizadas com o mesmo programa Image-Pro Plus, sendo, desta vez, acoplado às imagens um graticulo contendo 100 pontos. As regiões medular (porosidade) e trabecular, assim como outras regiões distais dos côneilos, foram marcadas e contadas, obtendo-se o percentual respectivo (**Figura 4**).

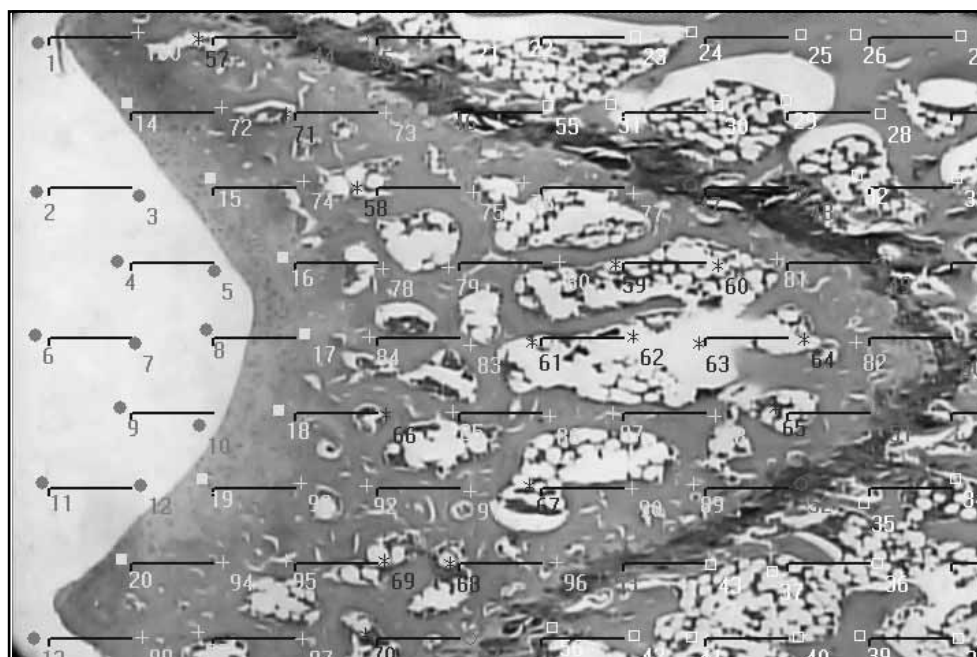
Para as contagens considerou-se apenas a região entre as cartilagens epifisária e articular, pertencentes aos ossos dos grupos OVX + T e OVX. A objetiva escolhida permitiu que se contasse o número de pontos coincidentes com cada estrutura analisada e, a partir daí, fosse calculado o percentual ocupado por cada estrutura epifisária no corte histológico. A medição da porosidade e da densidade trabecular óssea seguiu metodologia adaptada<sup>(30, 37)</sup>, de acordo com as fórmulas a seguir:

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

$$\text{Densidade trabecular óssea} = \frac{\text{Número de pontos sobre as trabéculas} \times 100}{\text{Número total de pontos}}$$



**Figura 3** – Imagens da histomorfometria na área medular de tíbia. (A) Medição automática da área medular delineada (segmentada) sobre fundo transparente; (B) segmentação automática da área medular sobre fundo branco (valor em  $\mu\text{m}^2 \times 10^6$ )



**Figura 4** – Côneilo femoral e graticulo para contagem de 100 pontos na imagem digitalizada sob aumento final de 20x mostrando marcação e contagem dos componentes epifisários por área tecidual

## Análise estatística

Todos os resultados por grupo foram expressos como média e desvio padrão, sendo avaliados estatisticamente mediante o programa GraphPad PRISM 5 for Windows. Os resultados de apenas dois grupos, e que apresentaram normalidade em sua distribuição, foram comparados pelo teste *t* de Student. Não havendo distribuição normal dos resultados, aplicaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Dunn's como *pos-hoc* para comparar os resultados que envolveram os três grupos estudados. Todos os testes foram aplicados com significância estabelecida a 5%.

## Resultados

Analizando a **Figura 5** em relação às diáfises femorais das ratas, pode-se notar valor significativamente superior na espessura cortical ( $\mu\text{m}$ ) do grupo C ( $625,78 \pm 81,48$ ) em relação aos grupos OVX + T ( $416,17 \pm 41,64$ ) e OVX ( $413,46 \pm 23,04$ ). Na medição da área medular ( $\text{mm}^2$ ), este

mesmo grupo C ( $2,97 \pm 0,18$ ) se mostrou estatisticamente diferente apenas em relação ao grupo OVX + T ( $2,07 \pm 0,25$ ), que apresentou o menor valor.

Ao analisarmos a espessura cortical e a área da cavidade medular nas diáfises das tíbias, não encontramos diferença estatística entre os três grupos. Porém, o grupo C, na mensuração da área medular, apresentou uma área média maior ( $1,41 \pm 0,42$ ) em relação aos outros dois, seguido do grupo OVX ( $1,37 \pm 0,16$ ), o qual, por sua vez, obteve valores superiores ao grupo OVX+T ( $1,24 \pm 0,15$ ) (**Figura 6**).

Nas epífises dos côndilos femorais, nem a análise da densidade percentual das trabéculas, nem a da porosidade óssea apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos analisados (**Tabela**).

## Discussão

É sabido que a tibolona é um fármaco de grande valor, sendo indicada para o tratamento dos sintomas da

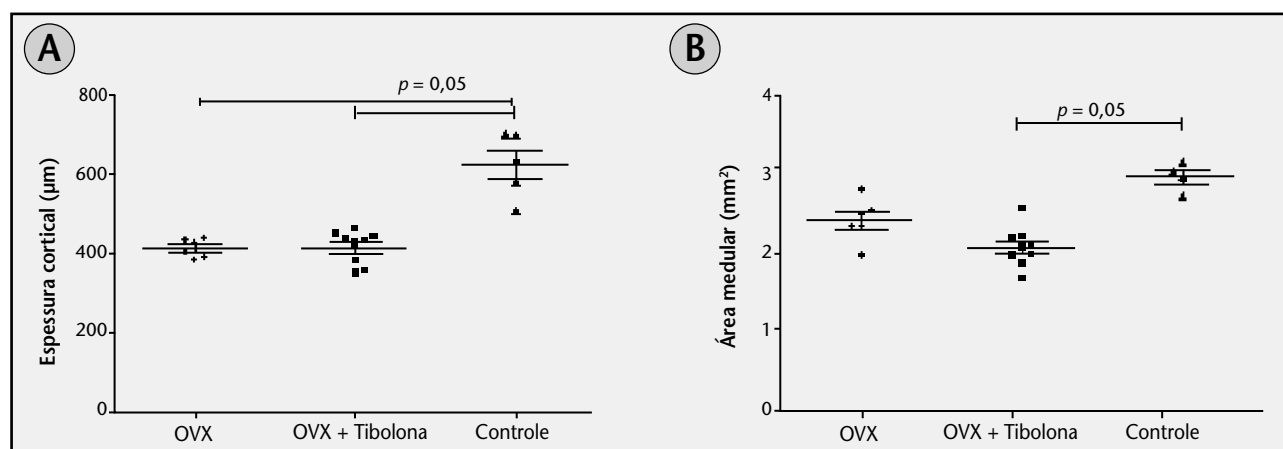


Figura 5 – Histomorfometria da diáfise femoral. (A) Espessura cortical; (B) área medular. Teste Kruskal-Wallis e Dunn's

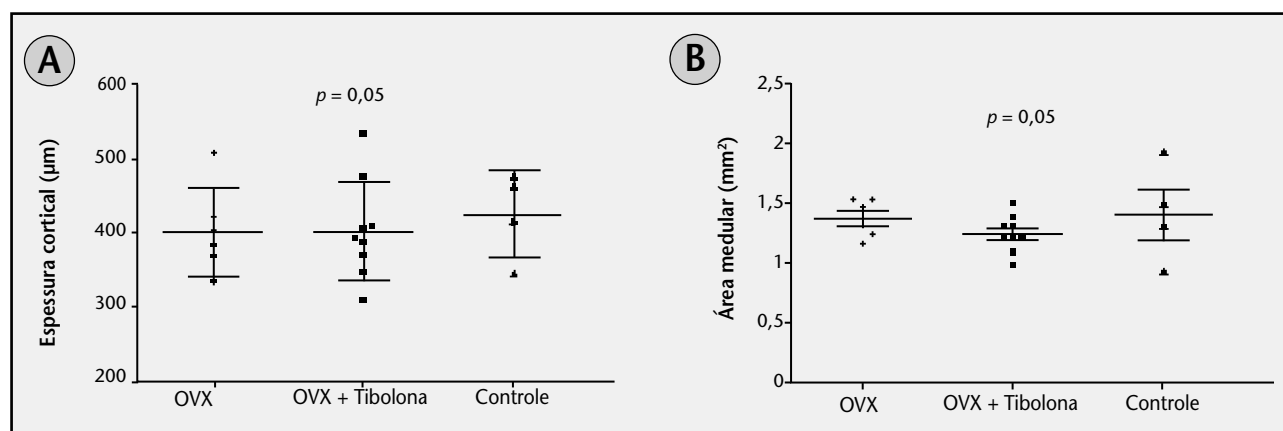


Figura 6 – Histomorfometria da diáfise tibial. (A) Espessura cortical; (B) área medular. Teste Kruskal-Wallis e Dunn's

**Tabela**      **Densidade trabecular e medular dos côndilos femorais de ratas castradas**

| <b>Grupo</b> | <b>Trabéculas (%)</b> | <b>Porosidade (%)</b> |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| OVX + T      | 19,4 ± 4,2            | 29,8 ± 6,9            |
| OVX          | 22,5 ± 3,7            | 31,5 ± 12,4           |

Teste t de Student ( $p > 0,05$ )

menopausa e prevenção da osteoporose, com comprovada eficácia. Contudo, atenção especial deve ser dada no que diz respeito a possível administração inadequada, já que uma redução excessiva da remodelação óssea pode comprometer a competência biomecânica do material ósseo em tratamentos a longo prazo<sup>(18)</sup>.

Considerando o aumento na expectativa de vida nas mulheres, bem como o constante estudo do mecanismo fisiopatológico da osteoporose e dos possíveis métodos terapêuticos, como a administração de tibolona, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de pesquisas relacionadas com os assuntos em questão. Todos esses fatores despertaram-nos o interesse em estudar o uso da tibolona inserida no protocolo proposto neste trabalho, analisando se o efeito que esta droga tem sobre os ossos continuaria a ser benéfico mesmo com o seu uso prolongado e em alta dosagem.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da tibolona, administrada em alta dose e por período prolongado, sobre o tecido ósseo de ratas adultas castradas. Escolheu-se a histomorfometria óssea como método de avaliação de densidade trabecular, espessura cortical e área medular em tíbias e fêmures desses animais.

Comparado com o organismo humano, o metabolismo das ratas é muito acelerado. A expectativa de vida da maioria das linhagens é em torno de dois e meio a três anos<sup>(7)</sup>. Estudos mostram que esses animais, com 24 meses de vida, correspondem aproximadamente a um indivíduo de 60 anos<sup>(32)</sup>. Isso significa que cada dia de vida do animal corresponderia a aproximadamente 30 dias na espécie humana<sup>(6, 23)</sup>. O atual experimento teve duração de 20 semanas, que, se extrapolarmos para o tempo de vida correspondente na mulher, significaria aproximadamente 11,5 anos. Por outro lado, ao comparar a atual pesquisa com a maioria dos experimentos em ratos, pode-se afirmar que o período de tratamento é prolongado, já que os trabalhos geralmente são efetuados por um período que varia de três dias<sup>(16)</sup> a seis semanas<sup>(13)</sup>.

A maior parte dos trabalhos em humanos usa a dose de 2,5 mg<sup>(20, 34, 40)</sup>, que corresponde, em uma mulher de 60 kg, a 0,041 mg/kg. Alguns trabalhos preconizam

ainda que uma dose inferior, de 1,25 mg, traria os mesmos efeitos benéficos<sup>(20, 26)</sup> ou seria ainda melhor<sup>(17)</sup>. A dose de tibolona utilizada no atual experimento foi considerada alta em comparação com a habitualmente empregada em humanos. Por meio da utilização do sistema alométrico<sup>(21)</sup> calculamos a dose equivalente para a rata, que seria de 0,161 mg/kg. Portanto, a dose utilizada nesta pesquisa, 1 mg/dia por animal com peso de 0,25 kg, corresponde a 4 mg/kg de peso corporal, sendo considerada, então, uma dose 24 vezes maior que a habitual em humanos.

Diante de tais fatos, se compararmos a atual pesquisa com a maioria dos experimentos em ratos, pode-se afirmar que o período despendido para a aplicação deste protocolo experimental foi longo, já que os vários trabalhos utilizando a tibolona geralmente são efetuados por um período curto e raramente se estendem até as 20 semanas<sup>(5)</sup>. Esse dado se torna ainda mais relevante se analisarmos apenas os trabalhos com osso, os quais variam de quatro<sup>(19, 35)</sup> a 16 semanas<sup>(46)</sup>. Apenas um trabalho relata o uso de tibolona durante 16 meses, em ratas ooforectomizadas, em que foram testadas diversas doses, sendo a maior de 0,5 mg/dia<sup>(18)</sup>.

Perante os trabalhos existentes com tibolona, bem como os diversos protocolos de administração da tibolona e análise de seus efeitos, nota-se o uso das mais variadas formas de administração deste fármaco. Encontram-se na literatura alguns trabalhos com tempo prolongado e outras pesquisas com altas doses, até maiores que a estipulada neste estudo, porém a combinação desses dois fatores torna-se relevante ferramenta de estudo ainda não explorada no meio científico, daí nosso interesse em analisar essa combinação. Conforme citado anteriormente, em um protocolo de 16 meses foram analisados os efeitos de 0,5 mg/dia de tibolona na massa óssea de ratas ooforectomizadas<sup>(18)</sup>. Entende-se por esse exemplo que, apesar do longo tempo, a dose administrada foi a metade da utilizada nesta pesquisa. Esse e mais outros exemplos constituem informações importantes diante dos resultados encontrados.

Mulheres idosas apresentam maior risco de fraturas de quadril em função da rápida perda óssea pela deficiência estrogênica<sup>(31)</sup>. Assim como em seres humanos, a

deficiência hormonal ovariana em ratos também acelera a remodelagem óssea. Ambos – ratos e humanos – exibem alterações similares na estrutura e massa óssea em diversos locais do esqueleto, por deficiência na produção de estrogênio<sup>(10)</sup>. Vários estudos têm demonstrado que a THS pode efetivamente prevenir a perda óssea tanto trabecular quanto cortical, reduzindo, assim, o risco de fraturas ósseas<sup>(14)</sup>.

Para a realização de um protocolo de indução da osteopenia nos animais deve-se privar a produção hormonal mediante o procedimento cirúrgico de ooforectomia. Estudos indicam que os efeitos da ooforectomia em ratos podem acontecer em um mês ou até menos<sup>(11, 35)</sup>, ocorrendo perdas ósseas características muito similares às do rato senil. Em nossos resultados, ao compararmos os grupos C e OVX, utilizando as medições histomorfométricas, o OVX apresentou valores inferiores em relação ao C, com diferença significativa para a espessura cortical da diáfise femoral.

Para analisar e discutir de que forma a administração da tibolona, com dose e tempo preestabelecidos, atuou nas tíbias e nos fêmures das ratas do grupo OVX+T, ambos os grupos castrados (OVX e OVX+T) foram comparados entre si.

Analisando primeiramente a cortical dos ossos, a tibolona neste estudo não teve efeito significativo na espessura cortical das diáfises de tíbia e fêmur. Entretanto, o grupo OVX + T apresentou valores maiores de espessura cortical, contrapondo-se com uma respectiva menor área medular. Isso sugere possível preservação de massa óssea nesta região para o grupo tratado com tibolona.

Nossos dados confirmam que a administração de alta dose (1 mg/rata/dia) de tibolona não tem efeito significativo na cortical da diáfise medial do fêmur, como demonstrado por meio das técnicas de tomografia computadorizada quantitativa periférica e densitometria quantitativa de Röntgen, avaliando a densidade mineral óssea em ratas ooforectomizadas<sup>(19)</sup>. Porém, resultados benéficos foram obtidos em quatro semanas usando-se dose menor (2,5 mg/kg/dia)<sup>(35)</sup>. Contudo, considerando o menor percentual de porosidade óssea nos côndilos femorais no grupo OVX + T, pode-se presumir que a atuação benéfica da tibolona ocorre principalmente no osso trabecular. Isto pode ser explicado pelo fato de que o osso trabecular é considerado mais responsivo aos hormônios, assim como a intervenções farmacológicas, se comparado com o osso cortical<sup>(1, 46)</sup>.

Resumindo, a tibolona preservou a massa óssea cortical nas diáfises femoral e tibial, mantendo a espessura cortical e a área medular em níveis aceitáveis, apresentando,

ainda, valores menores para percentual de porosidade no côndilo femoral. Diante dos resultados obtidos, podemos observar que a tibolona administrada, em alta dose e por tempo prolongado, a ratas ooforectomizadas determinou características ósseas similares àquelas das ratas nas mesmas condições de ooforectomia, porém sem tratamento hormonal. Sabe-se que a tibolona preserva a massa óssea de forma semelhante ao estrogênio pela inibição do aumento da reabsorção óssea induzida por ooforectomia, no entanto, se a redução da remodelagem óssea for excessiva, pode comprometer a competência biomecânica do material ósseo em tratamentos a longo prazo<sup>(18)</sup>.

É relevante considerar desde já a afirmação recém-exposta juntamente com os resultados adquiridos nesta pesquisa, além do fato de que doses inferiores já vêm sendo preconizadas<sup>(17)</sup>. Entende-se a importância do estudo sobre os efeitos de um fármaco amplamente utilizado por mulheres na pós-menopausa, cujas consequências de uma possível administração inadequada podem prejudicar todo o contexto clínico, social e psicológico dessas mulheres.

Independente da escolha da melhor técnica para auxílio diagnóstico, é comprovado que a tibolona tem ação estrogênica efetiva e benéfica em tecidos como vagina, sistema vascular e mesmo no osso<sup>(26, 31)</sup>. Porém, neste último tecido, a administração deste fármaco por tempo prolongado e em dose excessiva não melhorou a qualidade óssea cortical e trabecular nas regiões analisadas. Importante mais uma vez enfatizar que, apesar disso, a tibolona não foi nociva em relação à massa óssea, já que, comparado com o grupo OVX, o OVX + T apresentou-se similar nos parâmetros histomorfométricos analisados.

Dessa forma, com o conjunto de informações obtidas, pode-se levantar uma questão científica sobre o comportamento biológico dos modelos de estudo frente a medicamentos que, administrados em excesso de dose ou tempo, provoquem alterações ósseas não favoráveis ao objetivo primordial da terapêutica analisada. Entretanto é preciso ter precaução ao extrapolar esses resultados para a espécie humana, sendo necessários mais estudos a respeito do caso. A nova abordagem neste protocolo e os nossos resultados alertam sobre os cuidados que se devem ter com novos protocolos de reposição hormonal, considerando principalmente que atualmente as mulheres acabam por passar mais tempo fazendo uso de hormônios devido a uma vida mais prolongada no período da pós-menopausa, tendo sempre presentes o aumento ou a conservação da qualidade de vida.



## Conclusão

O uso prolongado em concomitância com alta dose de tibolona não melhorou de forma significativa a qualidade óssea, porém preservou a massa óssea cortical nas diáfises femoral e tibial, bem como o osso trabecular nos côndilos femorais de ratas castradas. Entendemos que a tibolona tem ação estrogênica efetiva no tecido ósseo e, mesmo aplicada em alta dose e por longo período, não mostrou, em nenhum momento, atividade prejudicial. Entretanto, é preciso ter precaução ao se extrapolar esses resultados para a espécie humana, principalmente para mulheres pós-menopáusicas que apresentem contraindicações absolutas ou relativas ao uso de estrogênio.

## Agradecimentos

À OFFICILAB pela gentil doação da tibolona.

Este trabalho, realizado no Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), é parte da dissertação de mestrado intitulada Efeito do uso prolongado de alta dose de tibolona no tecido ósseo de ratas castradas e apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UFF em 2009. O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) da UFF e respeita os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## Referências

1. ABRAHÃO, G. S. *et al.* Ação da atividade física sobre as propriedades mecânicas dos fêmures e tíbias de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras*, v. 14, n. 5, p. 242-5, 2006.
2. AMADEI, S. U. *et al.* A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
3. ARLOT, M. E. *et al.* Histomorphometric and  $\mu$ CT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J Bone Miner Res*, v. 23, n. 2, p. 215-22, 2008.
4. BOTSIS, D. *et al.* The effect of raloxifene and tibolone on the uterine blood flow and endometrial thickness: a transvaginal Doppler study. *Maturitas*, v. 53, n. 3, p. 362-8, 2006.
5. CALLEJO, J. *et al.* Hormonal environment in the induction of breast cancer in castrated rats using dimethylbenzanthracene: influence of the presence or absence of ovarian activity and of treatment with estradiol, tibolone, and raloxifene. *Menopause*, v. 12, n. 5, p. 601-8, 2005.
6. CAMPBELL, S. J. *et al.* Loss of the atypical inflammatory response in juvenile and aged rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 33, n. 1, p. 108-20, 2007.
7. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide to the care and use of experimental animals*. Ottawa, CCAC, v. I, p. 298, 1984.
8. CHEN, Y. T. *et al.* An approach for identifying postmenopausal women age 50-64 years at increased short-term risk for osteoporotic fracture. *Osteoporos Int*, v. 18, p. 1287-96, 2007.
9. CHIN, D. K. *et al.* Prevalence of osteoporosis in patients requiring spine surgery: incidence and significance of osteoporosis in spine disease. *Osteoporos Int*, v. 18, p. 1219-24, 2007.
10. COMELEKOGLU, U. *et al.* Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol*, v. 26, p. 380-4, 2007.
11. COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. *Physiol Rev*, v. 81, n. 1, p. 419-47, 2001.
12. CUMMINGS, S. R. *et al.* The effects of tibolone in older postmenopausal women. *N Engl J Med*, v. 359, n. 7, p. 697-708, 2008.
13. CZERNY, B. *et al.* Effect of tibolone on turnover of cholesterol to bile acids in ovariectomized rats. *Menopause*, v. 12, n. 5, p. 609-12, 2005.
14. DAMILAKIS, J. *et al.* An update on the assessment of osteoporosis using radiological techniques. *Eur Radiol*, v. 17, p. 1591-602, 2007.
15. DE LORENZI, D. R. S. *et al.* Factors related to quality of life in post-menopause. *Rev Assoc Med Bras*, v. 52, n. 5, p. 312-7, 2006.
16. DE GOOYER, M. E. *et al.* Tibolone is not converted by human aromatase to 7 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -ethynylestradiol (7 $\alpha$ -MEE): analyses with sensitive bioassays for estrogens and androgens and with LC-MSMS. *Steroids*, v. 68, n. 3, p. 235-43, 2003.
17. DELMAS, P. D. *et al.* Effects of tibolone and raloxifene on bone mineral density in osteopenic postmenopausal women. *Osteoporos Int*, v. 19, n. 8, p. 1153-60, 2008.
18. EDERVEEN, A. G. H. *et al.* Effect of 16 months of treatment with tibolone on bone mass, turnover, and biomechanical quality in mature ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, v. 16, n. 9, p. 1674-81, 2001.
19. EDERVEEN, A. G. H.; KLOOSTERBOER, H. J. Tibolone, a steroid with a tissue-specific hormonal profile, completely prevents ovariectomy-induced bone loss in sexually mature rats. *J Bone Miner Res*, v. 14, n. 11, p. 1963-70, 1999.
20. ETTINGER, B. Tibolone for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*, v. 57, p. 35-8, 2007.
21. FELIPPE, P. A. N. *Sistema alométrico ou cálculo de dosagem por taxa metabólica do animal*. Campinas,

- Unicamp. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/ceea/files/ceea/calculo.doc>>. Acesso em: 22 out. 2008.
22. JACOBSEN, D. E. *et al.* Efficacy of tibolone and raloxifene for the maintenance of skeletal muscle strength, bone mineral density, balance, body composition, cognitive function, mood/depression, anxiety and quality of life/well-being in late postmenopausal women  $\geq$  70 years: study design of a randomized, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, single-center trial. *Trials*, v. 9, p. 32-40, 2008.
  23. KANG, K. B. *et al.* Age-related changes in monocyte and platelet cyclooxygenase expression in healthy male humans and rats. *Transl Res*, v. 148, n. 6, p. 289-94, 2006.
  24. KANIS, J. A. *et al.* The use of multiple sites for the diagnosis of osteoporosis. *Osteoporos Int*, v. 17, p. 527-34, 2006.
  25. KARS DAL, M. A. *et al.* Tibolone inhibits bone resorption without secondary positive effects on cartilage degradation. *BMC Musculoskelet Disord*, v. 9, p. 153-60, 2008.
  26. KENEMANS, P. Tibolone: how does its mechanism of action translate into clinical effects. *Maturitas*, v. 48, p. S1-S3, 2004.
  27. KLOOSTERBOER, H. J. Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas*, v. 48, p. S30-S40, 2004.
  28. KLOOSTERBOER, H. J.; EDERVEEN, A. G. H. Pros and cons of existing treatment modalities in osteoporosis: a comparison between tibolone, SERMs and estrogen ( $\pm$  progestogen) treatments. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 83, p. 157-65, 2003.
  29. LESPESSAILLES, E. *et al.* Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. *Joint Bone Spine*, v. 73, p. 254-61, 2006.
  30. MORAES, F. P. *Análise histológica e morfométrica no fêmur de ratas (Rattus norvegicus) com osteoporose induzida*. 2006. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa.
  31. PALACIOS, S. Tibolone: a tissue-specific approach to the menopause. *Eur Heart J Suppl*, v. 3, Suppl M, p. M12-6, 2001.
  32. PANTALEÃO, J. A. S. *et al.* Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 31, n. 3, p. 124-30, 2009.
  33. PIOVESAN, A. C. *et al.* Estudo morfológico e molecular da mama das ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênio. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 27, n. 4, p. 204-09, 2005.
  34. PRELEVIC, G. M. *et al.* The effect of tibolone on bone mineral density in postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis - 8 years follow-up. *Maturitas*, v. 47, p. 229-34, 2004.
  35. PYTLIK, M. Effects of tibolone on the development of osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol*, v. 54, p. 35-43, 2002.
  36. RAÇÕES FRI-RIBE S. A. *A natureza em forma de ração*. Disponível em: <<http://www.fri-ribe.com.br/prod-produtos.php?dir=bd/lab/&id=rac&bg=lab>>. Acesso em: 20 mar. 2007.
  37. RAFFI, M. B. *et al.* Estudos histomorfométrico e histológico das lesões ósseas causadas por flúor em aves. *Pesq Vet Bras*, v. 17, n. 2, p. 69-76, 1997.
  38. REED, M. J.; KLOOSTERBOER, H. J. Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas*, v. 48, Suppl 1, p. S4-6, 2004.
  39. RENOUX, C. *et al.* Hormone replacement therapy use and the risk of stroke. *Maturitas*, v. 61, p. 305-9, 2008.
  40. RYMER, J. *et al.* Effects of 8 years of treatment with tibolone 2.5 mg daily on postmenopausal bone loss. *Osteoporos Int*, v. 12, p. 478-83, 2001.
  41. VAN DE WEIJER, P. H. M. *et al.* Benefits and risks of long-term low-dose oral continuous combined hormone therapy. *Maturitas*, v. 56, p. 231-48, 2007.
  42. VOS, R. M. E. *et al.* The *in vivo* human metabolism of tibolone. *Drug Metab Dispos*, v. 30, p. 106-12, 2002.
  43. WAGNER, S. *et al.* Diagnosis of osteoporosis: visual assessment on conventional versus digital radiographs. *Osteoporos Int*, v. 16, p. 1815-22, 2005.
  44. WANG, P. H. *et al.* Standard and low-dose hormone therapy for postmenopausal women: focus on the breast. *Taiwan J Obstet Gynecol*, v. 46, n. 2, p. 127-34, 2007.
  45. WEHBA, S. *et al.* Aspectos clínicos e metabólicos de mulheres na pós-menopausa tratadas com tibolona. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 22, n. 1, p. 37-41, 2000.
  46. YOSHITAKE, K. *et al.* Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a low-calcium diet. *Bone*, v. 25, n. 3, p. 311-9, 1999.

---

**Endereço para correspondência**

Ana Carolina Bergmann de Carvalho  
Departamento de Patologia da UFF  
Rua General Pereira da Silva, 212/1302 – Icaraí  
CEP: 24220-031 – Niterói, RJ  
Tel: (21) 2612-5198/(21) 8122-7360  
e-mail: carolberg12@hotmail.com