



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL



GUILHERME LUCIANO LEITE

***“ANÁLISE MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE LICOPENO”***

Ribeirão Preto

2019

Faculdade De Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia Básica e Oral

***“ANÁLISE MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE LICOPENO”***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a conclusão do curso
de graduação em Odontologia

Acadêmico: Guilherme Luciano Leite

Orientadora: Profa. Dra. Selma Siessere

**Ribeirão Preto
2019**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosana Cristina Tomé Leite e José Luciano Leite pelo apoio incondicional e por todo o suporte que recebi durante toda a minha vida. Obrigado por todos os ensinamentos, amor e confiança que me fizeram chegar até aqui e que me fizeram ser quem eu sou hoje.

À minha irmã, Vanessa Cristina Leite e familiares que sempre estiveram presentes na minha vida e que mesmo de forma inconsciente me deram força para continuar trilhando este caminho.

À minha namorada, Hévila Pereira Alvarenga, por todo o companheirismo, paciência, confiança e apoio durante toda a minha trajetória na graduação e antes dela. Obrigado por todos os momentos que compartilhamos e por todos os incentivos com palavras, gestos e sorrisos de coragem nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Selma Siéssere, por toda a orientação, pela paciência, confiança, apoio e atenção. Obrigado por ser um exemplo de profissional, a qual sempre terei como referência.

Aos colaboradores Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, Profa. Dra. Simone Cecilio Hallak Regalo, Dra. Priscilla Hakime Scalize, Especialista em Laboratório Luiz Gustavo de Sousa e Técnico Dimitrius Leonardo Pitol por toda atenção dispensada durante o desenvolvimento desta pesquisa.

E, por fim, a todos os meus amigos, em especial à Luana Cristina Freitas, que me acompanharam com muita dedicação e carinho para o sucesso desta pesquisa.



Este projeto de pesquisa foi realizado no Departamento Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio de pesquisa FAPESP (processo nº 2016/08754-2) com período de vigência de 01/09/2016 a 31/08/2017.

RESUMO

O Brasil vem mostrando uma grande melhora na qualidade de vida, entretanto, devido ao envelhecimento da população, é esperado um aumento da prevalência da osteoporose. Com isso, a preocupação desta doença crônica passa a ser um foco de atenção nas áreas médica, científica e financeira. Sabe-se que a homeostasia do tecido ósseo está intimamente ligada a fatores genéticos, frequência e qualidade de atividades físicas, níveis hormonais e a ingestão de alimentos ricos em nutrientes, minerais e vitaminas. Diversas pesquisas apontam a eficácia de uma alimentação balanceada com intuito de prevenir e tratar a osteoporose. O licopeno, um carotenoide existente no tomate e em outros vegetais, é um potente antioxidante que age no metabolismo ósseo, que por sua vez proporciona um equilíbrio entre as atividades celulares responsáveis pela sua manutenção. Assim, este estudo teve por objetivo verificar a eficácia da ingestão de licopeno no processo de reparação óssea em defeitos criados em calvárias de ratas ovariectomizadas. Quinze ratas Wistar foram ovariectomizadas bilateralmente e foram divididas aleatoriamente em três grupos: ovariectomizado (O_{VX}); ovariectomizado + licopeno administrado após a ovariectomia e após a confecção do defeito (O_{VXL}) e ovariectomizado com administração de licopeno somente após a confecção do defeito (O_{VXLD}). Cinco animais tiveram a exposição sem a excisão dos ovários e estes constituíram o Grupo Controle/Sham (GC). Os defeitos ósseos (5 mm) foram criados 60 dias após a ovariectomia e foram preenchidos por coágulo. O licopeno foi administrado por meio de sonda gástrica, na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal. Após 31 dias, as calvárias foram removidas para processamento histológico e análise quantitativa do tecido ósseo neoformado utilizando o software Image J. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e à análise estatística (ANOVA) para $p < 0,05$. Os resultados obtidos para os grupos GC, O_{VX} , O_{VXL} e O_{VXLD} foram respectivamente: $8,78 \pm 2,14$; $11,83 \pm 1,57$; $19,34 \pm 2,91$ e $11,22 \pm 1,62$ ($p < 0,05$). Pode-se concluir que, o licopeno quando administrado por um período de 90 dias e logo após a ovariectomia, favoreceu o reparo ósseo.

Palavras-chave: morfometria; licopeno; reparo ósseo; osteoporose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
2. PROPOSIÇÃO	08
3. MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1. Obtenção dos animais procedentes do biotério de reprodução e manutenção	09
<i>I) Tratamento dos animais</i>	09
<i>a) Indução à osteoporose</i>	09
<i>b) Grupos experimentais</i>	13
<i>II) Administração in vivo do licopeno</i>	14
3.2. Realização dos defeitos ósseos críticos e tratamentos associados	15
3.3. Eutanásia e coleta de material	19
3.4. Processamento histológico	20
<i>I) Análise morfológica (qualitativa) ao microscópio de luz</i>	20
<i>II) Análise quantitativa</i>	21
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Análise histológica qualitativa	23
5.2. Análise quantitativa	26
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A existência de relatos, em 1995, que cerca de 13 bilhões de dólares foram utilizados em 580.000 fraturas relacionadas com a osteoporose foi um dos fatores que despertou grande preocupação e discussão no meio científico. Definida como “epidemia do século 21”, a osteoporose evolui gradativamente durante anos de forma silenciosa sem a concepção do portador, até o momento em que ocorre uma fratura (Guarniero; Oliveira, 2004).

Segundo a International Osteoporosis Foundation (IOF, 2016) a cada três segundos uma fratura é decorrente da doença, variando a incidência entre grupos populacionais e países. Isso vem aumentando devido ao crescente número da população idosa e a insistência nos hábitos irregulares de crianças e adolescentes com relação à alimentação e atividade física (Souza, 2010).

Caracterizado como um distúrbio osteometabólico, a osteoporose ocasiona uma diminuição gradativa da densidade óssea, comprometendo microscopicamente a arquitetura esquelética e deixando-a frágil, aumentando os riscos de fratura (Neto, 2002). A osteoporose pode ocorrer independente da idade, porém há uma prevalência em mulheres brancas no período pós-menopausa, uma vez que os níveis do hormônio estrógeno diminuem e este possui íntima relação com o tecido ósseo. Algumas medidas profiláticas como exercícios físicos de resistência, ingestão de cálcio e vitamina D, podem reduzir os riscos de fratura assim como elevar os níveis de massa óssea (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001).

Sabe-se que 38% a 54% dos relatos da osteoporose, uma doença crônica não transmissível, estão relacionados com o modo de vida e a nutrição de cada indivíduo. A ingestão de uma dieta balanceada constituída de uma riqueza nutricional, além do cálcio e a vitamina D como já citados, é extremamente importante para um desenvolvimento e aumento da massa óssea, obtendo melhor proteção com benefícios à saúde do tecido ósseo (Neto, 2002). Alimentos como frutas e verduras que contém carotenoides têm sido cada vez mais indicados, pois uma vez consumidos, são transformados em vitaminas pelo nosso organismo proporcionando uma fonte preventiva contra a perda óssea (Carvalho, 2013).

Os carotenoides são hidrocarbonetos que por sua vez subdividem-se

quimicamente em xantofilas (contêm moléculas oxigenadas) e carotenos (sem moléculas oxigenadas, apenas hidrocarboneto). Geralmente mais de 600 tipos são encontrados na natureza sob a forma de pigmentos orgânicos, sendo estes, laranja, amarelo ou vermelho nos quais são sintetizados por plantas, fungos e bactérias (Engelmann et al., 2011). Conhecido como um alimento funcional, sua geometria molecular é responsável pela semelhança com estruturas celulares que permite uma função eficaz e atua de forma direta na prevenção e redução de doenças (Jáuregui et al., 2011).

Um tipo de carotenoide amplamente estudado atualmente é o licopeno que é caracterizado como um fitoquímico de natureza lipofílica, e é encontrado em tomates e derivados (sucos e molhos) que proporciona a coloração vermelha característica do fruto (Holzapfel et al., 2013). O pigmento é constituído de carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo uma molécula acíclica e poli-insaturada. É amplamente conhecido pelo seu potencial antioxidante o qual é extremamente importante para o nosso organismo uma vez que, por processos metabólicos produzimos radicais livres induzindo à oxidação e produção de diversas substâncias químicas prejudiciais que causam danos celulares (Weber, 2016).

Segundo Imura et al. (2014) a ingestão de licopeno foi capaz de facilitar a formação óssea e inibir a reabsorção óssea em ratas jovens.

Além disso, outros estudos demonstraram que uma alta ingestão de licopeno pode influenciar positivamente no sistema esquelético inibindo a reabsorção óssea em ratas induzidas a uma osteoporose por déficit do hormônio estrógeno além de facilitar a formação óssea com consequente aumento da sua densidade (Imura et al., 2015; Soltysiak; Folwarczna, 2015).

Ainda de acordo com Mackinnon et al. (2011) o consumo diário de licopeno é importante para diminuir o stress oxidativo e a reabsorção óssea, trazendo benefícios para mulheres no período pós-menopausa, diminuindo os riscos de osteoporose.

A hipótese desse trabalho é a de que a administração *in vivo* do licopeno possa influenciar positivamente no processo de reparo ósseo em defeitos de calvárias em ratas com modelo experimental para a osteoporose.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da ingestão do licopeno no processo de reparação em defeitos ósseos em calvárias de ratas com modelo experimental para a osteoporose por meio de:

- análise morfológica do tecido ósseo neoformado por meio de confecção de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson;
- análise quantitativa do tecido ósseo neoformado por meio de contagem diferencial de pontos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Obtenção dos animais procedentes do biotério de reprodução e manutenção

No experimento foram utilizadas 20 ratas Wistar com uma média de 300g de peso corporal. Os animais eram provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. As ratas foram mantidas em número de três animais por caixa de polietileno, com temperatura ambiente controlada entre máxima de 24 e mínima de 23°C e com timer programado para doze horas de iluminação diária. Os animais receberam ração e água “ad libitum”. Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FORP/USP – Protocolo n. 2016.1.392.58.5.

1) Tratamento dos Animais

a) Indução da osteoporose

Após a primeira semana 15 animais foram ovariectomizados bilateralmente.

Os animais foram pesados e então anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xilazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular e Dopalen (Cloridrato de Cetamina) - anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA- Campinas, SP, Brasil, na proporção de 75mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e de 10mg/Kg de Xilazina, injetada por via intramuscular.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais. Foram aplicadas gazes esterilizadas embebidas em soro fisiológico a 0,9% em ambos os olhos dos animais, com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas durante a cirurgia.

Foi feita a antisepsia dos locais incisionados com álcool iodado (PVPI). Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos (Kalu, 1991). Fez-se a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho.



Figura 1 - Cirurgia de ovariectomia para a excisão do ovário.

Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de analgésico Flunixinameglumina (1,1mg/Kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil) e de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilinabenzatina (156.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por sessenta dias e receberam ração e água “ad libitum”.

Os animais operados ficaram sob observação constante, foi feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

A comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia foi feita pelo exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos.

Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral, por meio da coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos. Para o desenvolvimento desta técnica de observação foi introduzido, com o auxílio de uma ponteira pequena acoplada a uma micropipeta, uma dose de solução salina (cerca de 1mL) no interior da vagina da rata. Após a introdução a

solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica. Este procedimento foi realizado no início da manhã.

A literatura mostra que esta técnica é ideal para investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo. O período do ciclo estral das ratas dura de 4 a 5 dias. Este ciclo pode ser dividido em quatro fases: metaestro, diestro, proestro e estro. Cada uma das fases se caracteriza por apresentar um tipo de célula predominante que pode ser facilmente observado nos esfregaços da vagina, assim como, o nível de hormônios sexuais presentes no animal. Na fase Metaestro, observam-se leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. Na fase Diestro observam-se basicamente leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno. Na terceira fase, Proestro, o número de células epiteliais nucleadas aumenta enquanto os leucócitos praticamente desaparecem, ocorrendo neste momento o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona, enquanto na fase Estro são visualizadas basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna aos valores basais (Hoar; Hickman, 1975; Marcondes et al., 2002).

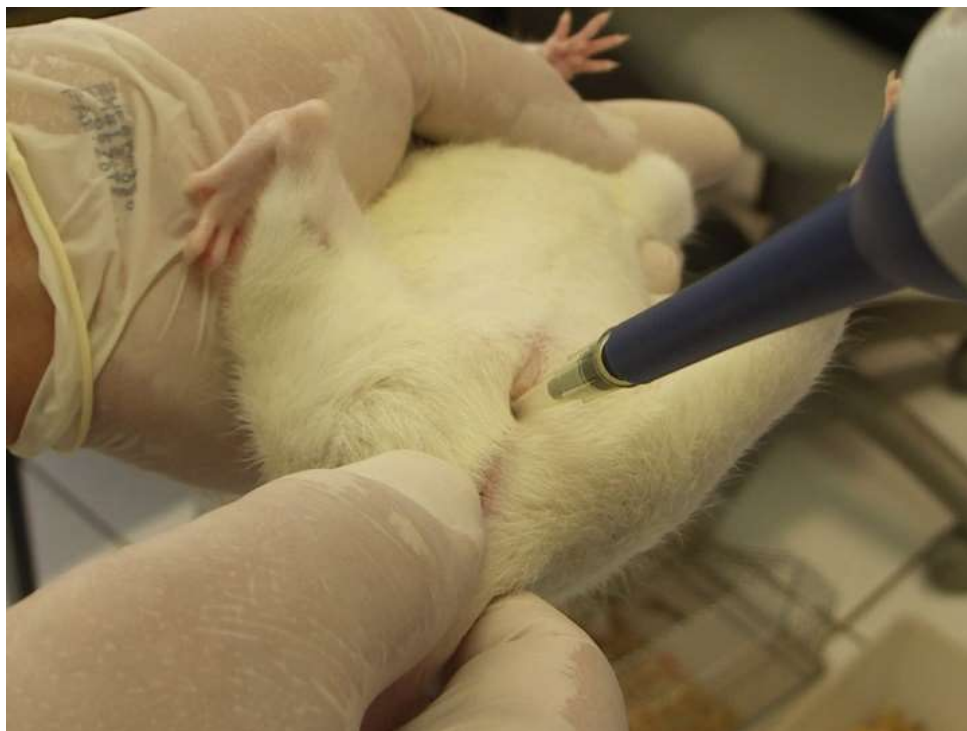


Figura 2 – Coleta do fluido vaginal para a realização do exame do ciclo estral.

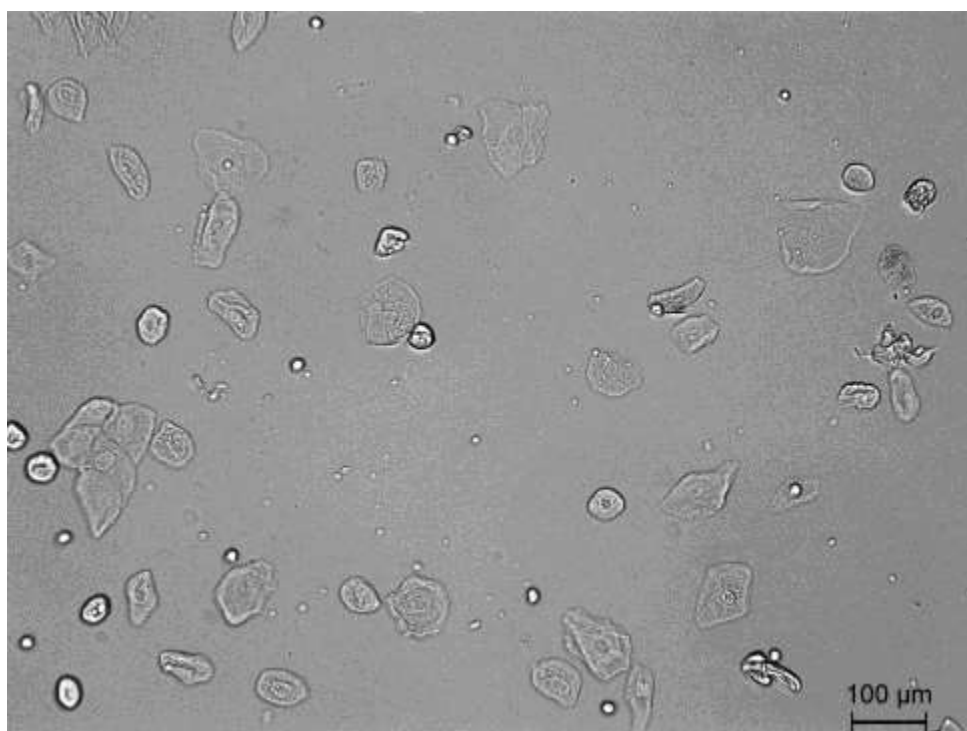


Figura 3 - Fotomicrografia de fluido vaginal não corado. Rata controle na fase proestro com predominância de células epiteliais nucleadas.

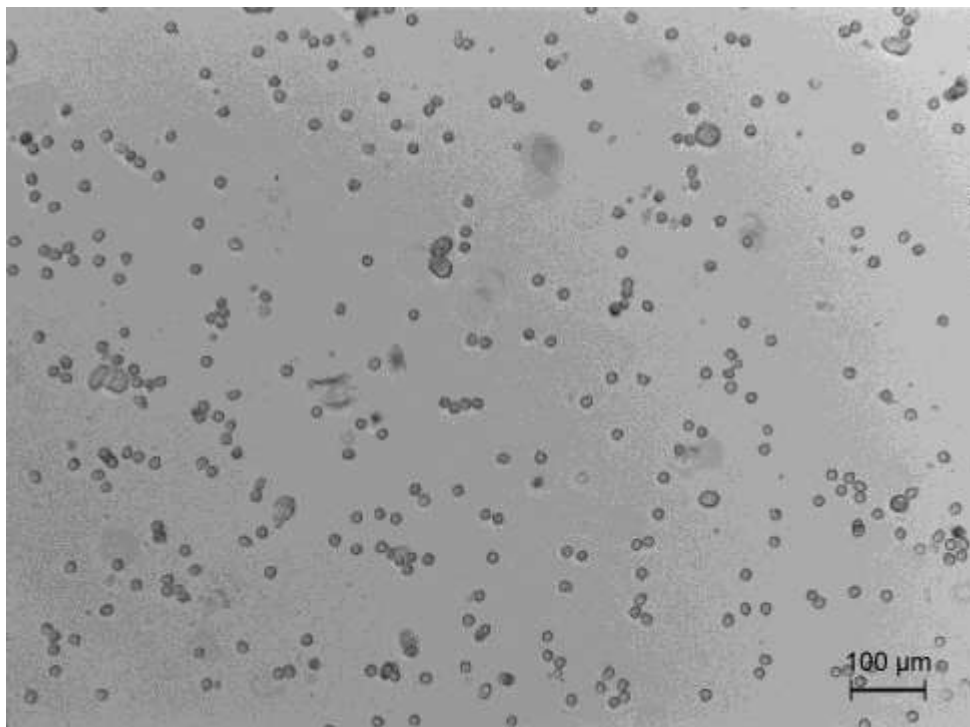


Figura 4 - Fotomicrografia de fluido vaginal não corado. Rata ovariectomizada na fase diestro, com predominância de leucócitos.

b) Grupos experimentais

Grupo Controle - Sham

Os animais deste grupo foram submetidos ao estresse da cirurgia, com anestesia, exposição dos ovários e sutura dos tecidos. Estes também receberam, via intramuscular, uma única dose de analgésico Flunixinameglumina (1,1mg/Kg) (Banamine, Schering- Plough, Brasil) e de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilinabenzatina (156.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por sessenta dias e receberam ração e água “ad libitum”.

Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca de maravalha, três vezes por semana.

Grupos experimentais

Os animais do grupo Sham constituíram o Grupo Controle (C). Os animais ovariectomizados foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: Grupo Ovariectomizado (O_{VX}), Grupo Ovariectomizado com administração de licopeno, ou seja, após cirurgia de ovariectomização e de confecção do defeito ósseo (O_{VXL}) e Grupo ovariectomizado com administração de licopeno somente após a confecção do defeito ósseo (O_{VXLD}).

II) Administração in vivo do licopeno

Utilizou-se o licopeno (Kangdou Biotech, China) na concentração de 10%, com certificado de controle de qualidade emitido pela SM Empreendimentos Farmacêuticos (São Paulo). Após sua solubilização em água, o licopeno foi administrado por meio de sonda gástrica, na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal (adaptado de Luvizotto et al., 2013). Para assegurar a correta dosagem, os animais eram pesados cada vez que o licopeno fosse administrado. Como foi relatado anteriormente somente os grupos O_{VXL} e O_{VXLD} receberam o licopeno. O grupo O_{VXL} começou a receber o licopeno no dia seguinte à cirurgia de ovariectomização e este foi administrado a cada 24 horas por 2 meses. Após a criação do defeito ósseo, a administração de licopeno foi continuada por um período de 30 dias a cada 24 horas. No dia seguinte à cirurgia de ovariectomização bilateral, os animais do grupo O_{VXLD} receberam água, por sonda gástrica e esta foi mantida a cada 24 horas por 2 meses, na qual os animais deste grupo, foram submetidos ao mesmo nível de estresse que os animais do grupo O_{VXL} . O grupo O_{VXLD} começou a receber o licopeno no dia seguinte à confecção do defeito e este foi mantido por um período de 30 dias, a cada 24 horas.

Os animais dos grupos C e O_{VX} receberam a administração de água, por meio de sonda gástrica, durante todo o período de experimentação.



Figura 5 - Administração da solução de licopeno por meio da utilização de sonda gástrica.

3.2. Realização dos defeitos ósseos críticos e tratamentos associados

Passados 60 dias da cirurgia de ovariectomização, foram confeccionados os defeitos ósseos em todos os animais.

Os animais foram pesados e anestesiados com a mistura de 75mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e de 10mg/Kg de Xilazina, injetada por via intramuscular e foram submetidos a uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão na região lateral da calvária (osso parietal direito), com lâmina de bisturi estéril número 15, previamente montada em cabo de bisturi número 3, de modo a expor a região óssea que se desejasse ter acesso.

Na calvária exposta foi realizada a criação de um defeito ósseo na região central do osso parietal esquerdo.

Para isso utilizou-se uma broca trefina de 5 mm de diâmetro adaptada em contra-ângulo e com o auxílio de um motor elétrico para implantes (Dentscler, Ribeirão Preto, SP, Brasil), ajustado em 3000 rpm, com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%; procedeu-se a perfuração criando um defeito ósseo cilíndrico de 5 mm de diâmetro, estando esta dimensão dentro dos padrões citados na literatura.

Após a confecção do defeito, procedeu-se à sutura dos tecidos. A pele do animal, juntamente com o periósteo foi reposicionada a sua posição original, suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do retalho.

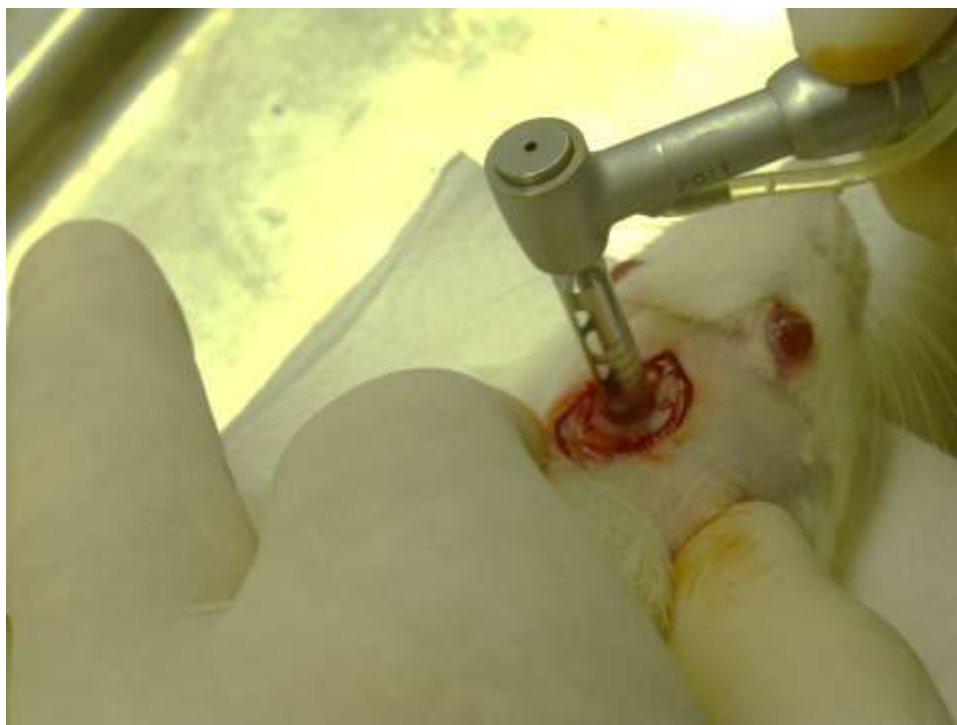


Figura 6 - Confecção do defeito ósseo com broca trefina.

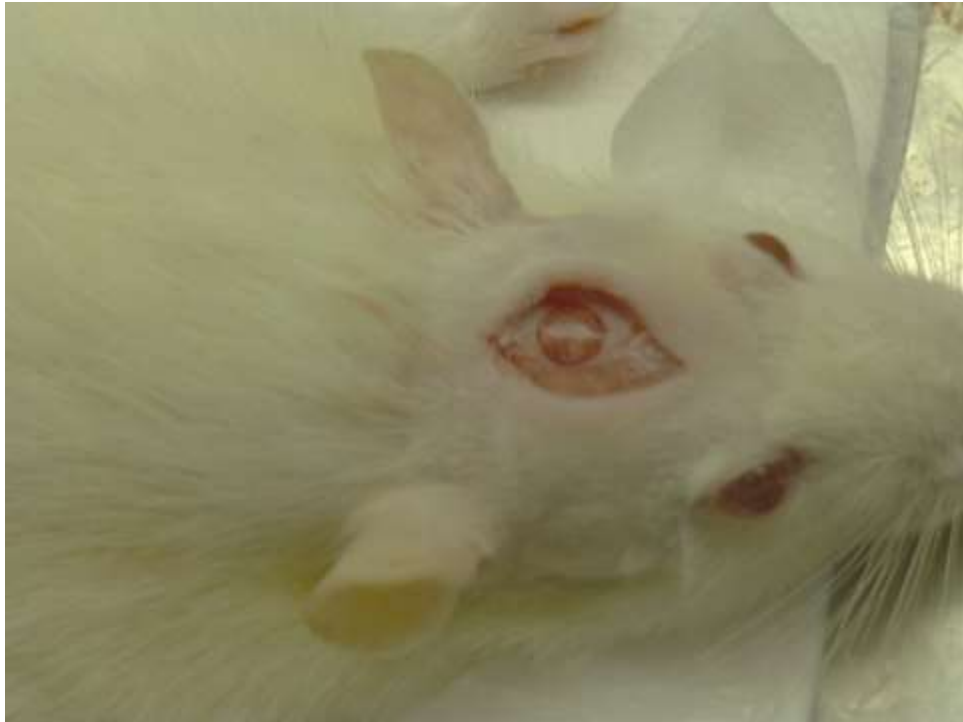


Figura 7 - Defeito ósseo de 5 mm de diâmetro no osso parietal esquerdo.



Figura 8 - Sutura na região do defeito ósseo.

Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam dose única de analgésico Flunixinameglumina (1,1mg/Kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilinabenzatina (156.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por mais trinta e um dias e receberam ração e água “ad libitum”.

Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

Quadro 1: Distribuição dos animais em relação ao tratamento e tipos de análises a que foram submetidos.

Grupos	Tratamentos	Tipo de Análise	Animais
1 – C	Estresse da cirurgia de ovariectomização + administração de água	Morfológica e quantitativa	n=5
2 - O _{VX}	Ovariectomia bilateral + administração de água	Morfológica e Quantitativa	n=5
3 –O _{VX} L	Ovariectomia bilateral + administração de licopeno antes e após a confecção do defeito ósseo	Morfológica e quantitativa	n=5
4 –O _{VX} LD	Ovariectomia bilateral + administração de água após a ovariectomização bilateral + administração de licopeno após a confecção do defeito Ósseo	Morfológica e quantitativa	n=5

3.3. Eutanásia e Coleta de Material

Trinta e um dias após a confecção do defeito ósseo, as ratas foram eutanasiadas por meio de anestesia seguida por decapitação. Os animais foram pesados e anestesiados com a mistura de 75mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e de 10mg/Kg de Xilazina por via intramuscular.

Durante o processo de eutanásia dos animais, foi possível avaliar, também, o efeito da ovariectomia, por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos. A região abdominal foi incisionada para localização das respectivas estruturas e nos animais ovariectomizados (com deficiência de hormônio) os cornos uterinos apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos.

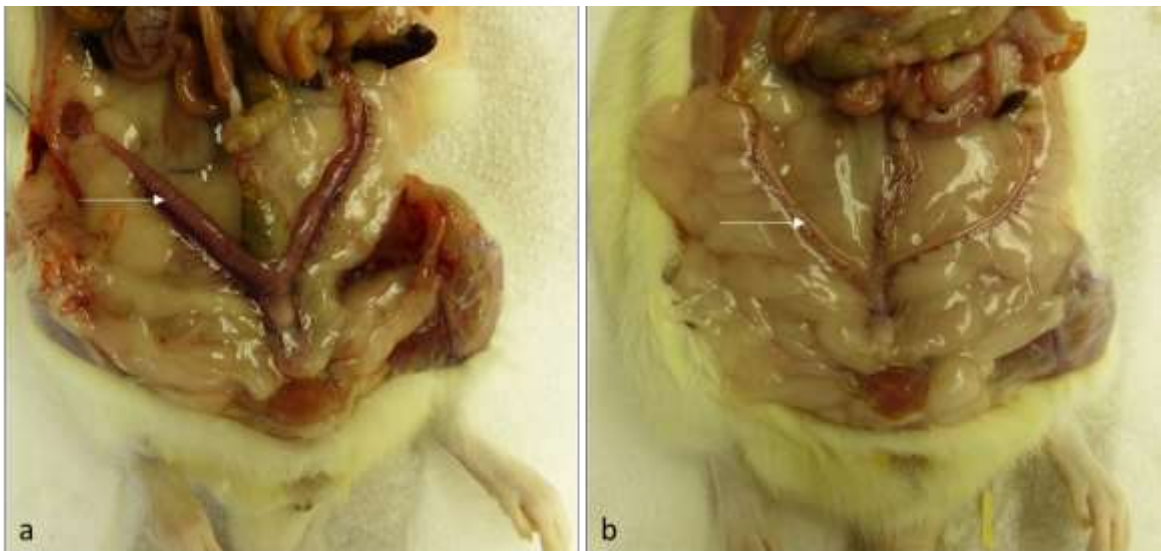


Figura 9 – Em a: Cornos uterinos de aspecto normal (seta) em rata do grupo controle (não ovariectomizada); b: Cornos uterinos atrofiados (seta) confirmando o sucesso da ovariectomia.

Após a decapitação foram obtidos fragmentos ósseos contendo o defeito ósseo com margem de segurança.



Figura 10 - Fragmento ósseo com margem de segurança para processamento histológico.

3.4. Processamento Histológico

Os fragmentos foram imersos em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções foram trocadas a cada dois dias. Após o período de descalcificação, que foi de aproximadamente trinta dias, a ação do ácido foi neutralizada, em uma solução de sulfato de sódio a 5%, por vinte e quatro horas. Após esse período, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram realizados cortes verticais ao tecido de 6 μ m de espessura, e estes foram corados em Hematoxilina – Eosina (que permitiu a avaliação morfológica simples do tecido ósseo neoformado) e Tricrômio de Masson (que permitiu a avaliação morfológica detalhada do tecido ósseo neoformado).

1) Análise morfológica (qualitativa) ao microscópio de luz

A análise qualitativa das lâminas permitiu avaliar o osso neoformado na área de criação do defeito ósseo crítico, bem como diferenciar o osso existente e o

neoformado nos grupos experimentais. Foi utilizado um microscópio de luz Leica DM 4000B, acoplado a uma câmera digital de vídeo Leica EC3 para captura das imagens as quais foram analisadas em objetivas de 10X, 20X e 40X.

II) Análise quantitativa

A quantidade de osso neoformado de cada animal foi analisada pelo Método de Contagem Diferencial de Pontos (Weibel et al., 1966). Foi utilizado um sistema-teste composto de linhas verticais e horizontais interpoladas sobre campos aleatórios para determinação da percentagem relativa da área de osso neoformado. A área (A) foi determinada pela relação dos pontos que estivessem sobre tecido ósseo neoformado (P_p) e o total de pontos do sistema teste (P_t), sendo representada pela seguinte fórmula: $A = P_p/P_t$ (%). Foram obtidas 40 imagens por animal, totalizando 240 imagens por grupo.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados quantitativos foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o software Sigma Plot 11.0. Observou-se uma distribuição normal em todos os dados obtidos (Shapiro Wilk, $p > 0,05$) o que possibilitou utilizar o teste estatístico análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparar os grupos. A significância foi fixada em 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Análise histológica qualitativa

Ao analisar as lâminas histológicas de todos os grupos estudados, foi possível observar neoformação óssea na periferia do defeito ósseo. Além disso, em todos os grupos foi detectada a presença de um tecido conjuntivo espesso com quantidade variada de vasos sanguíneos, próximo ao tecido ósseo neoformado. Foi possível observar também, que a região central do defeito também estava preenchida por tecido conjuntivo. Não foi observado infiltrado de células inflamatórias nos grupos estudados.

No grupo controle foi detectado pouco osso neoformado com a presença de tecido conjuntivo espesso com grande quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos. (Figura 11). O osso neoformado presente no grupo ovariectomizado apresentou-se envolvido por osteoblastos achatados, com grande quantidade de vasos e osteócitos alojados em lacunas (Figura 12).

No grupo que recebeu o licopeno logo após a cirurgia de ovariectomização, foi evidente uma maior neoformação de tecido ósseo, além da presença de grande quantidade de osteócitos alojados em lacunas, vasos e osteoblastos ativos adjacentes ao osso neoformado. Observou-se também, que o tecido conjuntivo era espesso e bem organizado possuindo grande quantidade de vasos e fibras (Figura 13). No grupo que recebeu licopeno após a confecção do defeito ósseo, foi possível observar osteoblastos ativos adjacente ao osso neoformado, assim como um tecido conjuntivo espesso e organizado com poucos vasos sanguíneos em seu interior (Figura 14).

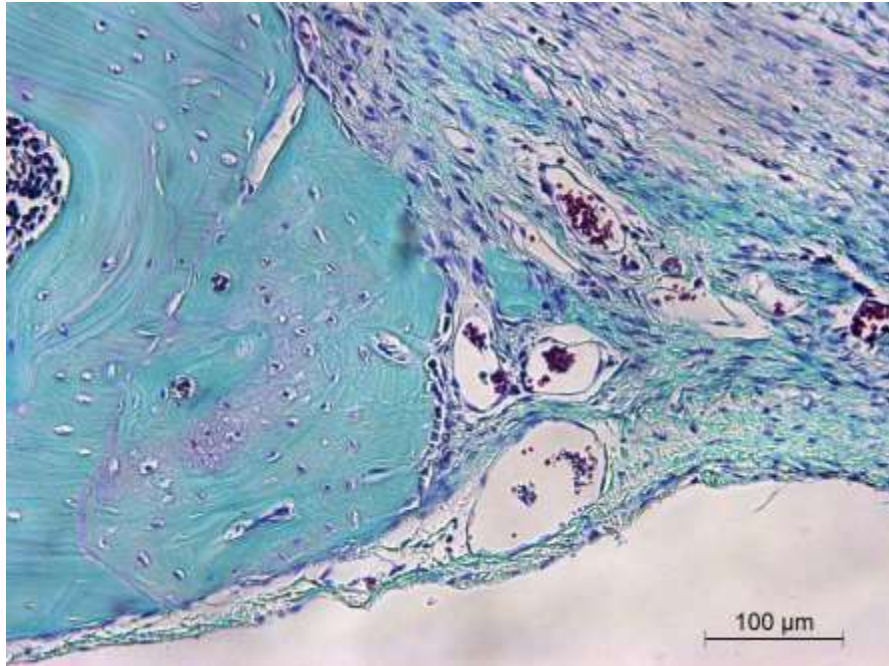


Figura 11 - Tecido ósseo neoformado presente na periferia do defeito ósseo da calvária de ratas controles. Coloração de Tricrômico de Masson.

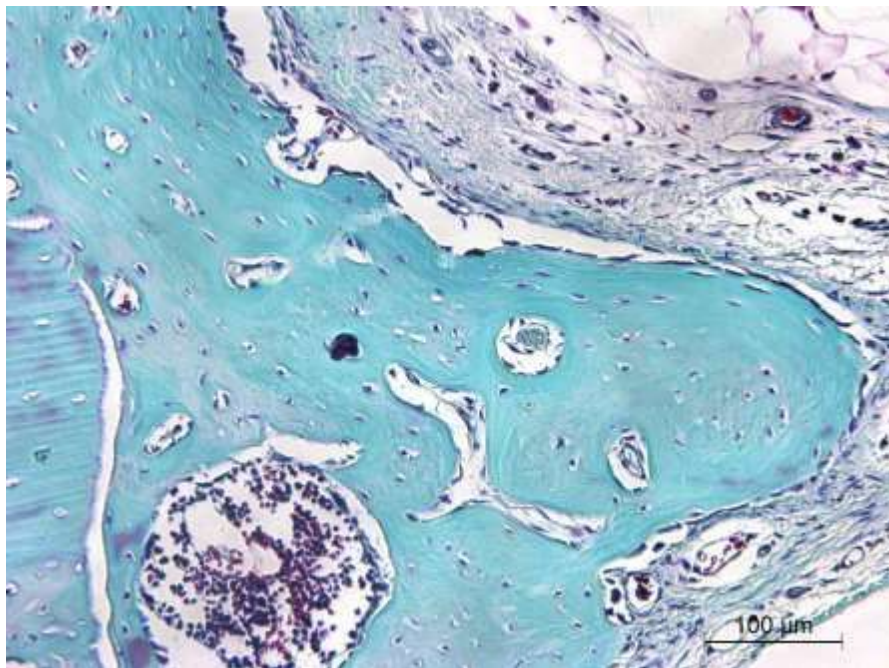


Figura 12 - Tecido ósseo neoformado presente na periferia do defeito ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas. Coloração de Tricrômico de Masson.

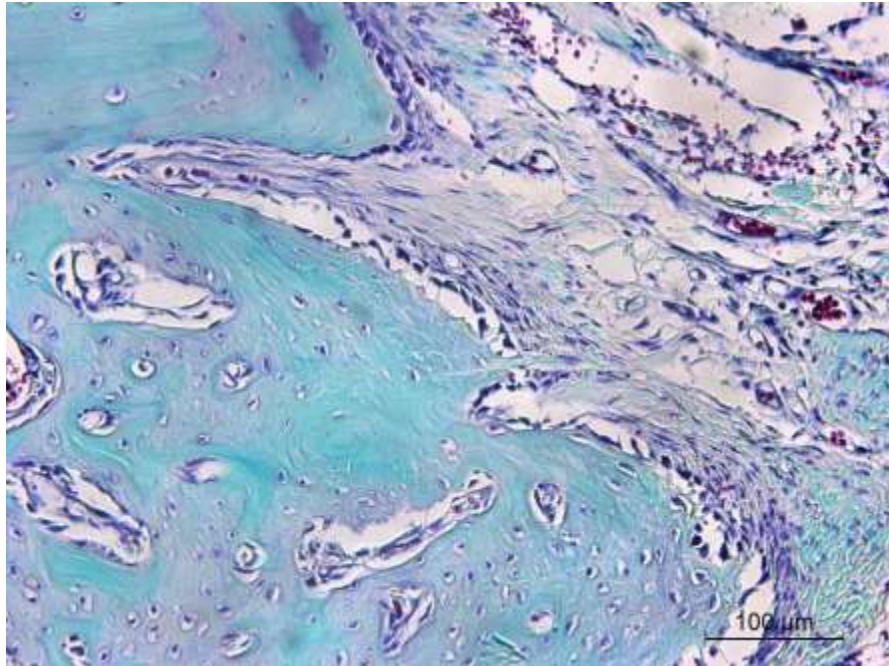


Figura 13 - Tecido ósseo neoformado presente na periferia do defeito ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas + Licopeno após a cirurgia de ovariectomia. Coloração de Tricrômico de Masson.

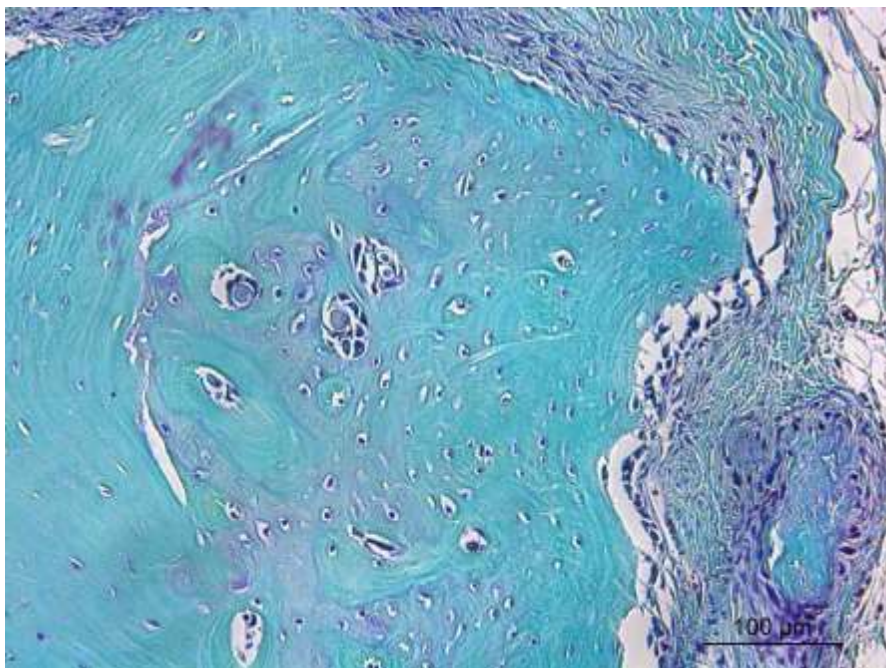


Figura 14 - Tecido ósseo neoformado presente na periferia do defeito ósseo da calvária de ratas ovariectomizada + Licopeno após a criação do defeito. Coloração de Tricrômico de Masson.

5.2. Análise quantitativa

Os resultados encontrados na análise quantitativa dos grupos Controle (C), Grupo Ovariectomizado (O_{Vx}), Grupo Ovariectomizado com administração de licopeno continuada (O_{VxL}) e Grupo ovariectomizado com administração de licopeno somente após a confecção do defeito ósseo (O_{VxLD}) estão representados nas Tabelas 1 e 2 e na Figura 15. Os grupos O_{VxL} e O_{Vx} apresentaram a maior quantidade de osso neoformado ($p < 0,05$). A menor área de osso neoformado ocorreu no Grupo Controle (C).

Tabela 1 – Valores médios da área de osso neoformado (porcentagem) para os Grupos Controle (C); Ovariectomizado (O_{Vx}); Ovariectomizado com administração de licopeno continuada); e Grupo ovariectomizado com administração de licopeno somente após a confecção do defeito ósseo (O_{VxLD}).

Grupos	C	Ovx	O_{VxL}	O_{VxLD}
	8,78±2,14	11,83±1,57	19,34±2,91	11,22±1,62

Tabela 2 - Significância (p) entre os grupos analisados para o parâmetro volume ósseo. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Área de Osso Neoformado	
Grupos	p
C vs. Ovx	0.3592
C vs. O_{VxL}	0.0014
C vs. O_{VxLD}	0.5310
Ovx vs. O_{VxL}	0.0110
Ovx vs. O_{VxLD}	0.9842
O_{VxL} vs. O_{VxLD}	0.0070

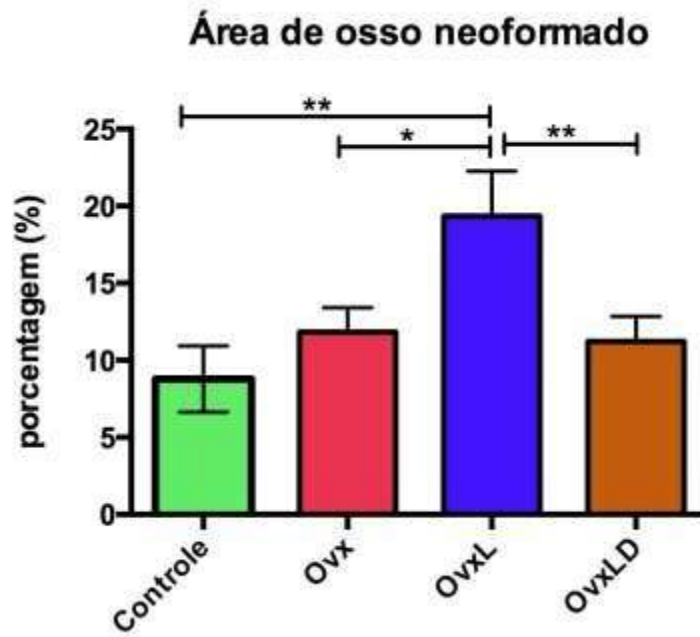


Figura 15 –Valores médios da área de osso neoformado e desvio-padrão nos grupos controle (C), ovariectomizado (Ovx), ovariectomizado + licopeno (OvxL) e ovariectomizado + licopeno após a criação do defeito ósseo (O_vxLD). * p<0,05 ** p<0,01

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito sistêmico do licopeno sobre o reparo de defeitos ósseos em calvária de animais ovariectomizados.

As características semelhantes da perda óssea que ocorrem em ratas ovariectomizadas e nas mulheres no período após a menopausa (Kalu, 1991) demonstram a confiabilidade do modelo experimental utilizado neste estudo. Além disso, estudos sobre osteoporose, reconhecem que este modelo é altamente preconizado na literatura (Frost; Jee, 1992).

Um fato que tem sido bastante observado nos vários estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, e que aqui também foi observado, é que dentre os animais que não receberam o licopeno, o grupo ovariectomizado apresentou maior formação óssea que o grupo controle, no entanto não foi observada significância estatística. É possível que o organismo possua uma reparação frente à osteoporose, com uma maior energia metabólica, devido à uma maior formação de ATP (Yu et al., 2012). Por outro lado, foi verificado que células tronco do ligamento periodontal originadas de ratas osteoporóticas apresentam uma resposta à ausência de estrógeno no terceiro mês pós- ovariectomia e que estas células exibem um aumento na sua habilidade de proliferar porém uma menor capacidade de diferenciação em osteoblastos (E et al., 2016).

De acordo com a literatura, o licopeno tem sido utilizado para o tratamento de doenças crônicas, por exemplo, como coadjuvante no tratamento de câncer de próstata e doenças cardíacas (Rowles et al., 2017; Cicero et al., 2017).

Na osteoporose, existem relatos da ação benéfica do carotenoide licopeno em modelos *in vitro*, sendo escassos os estudos utilizando essa substância em modelos osteoporóticos *in vivo*, tendo a calvária como alvo de análise da reparação óssea, o que torna difícil a comparação direta dos resultados.

Nossos resultados histomorfométricos mostraram que os animais que receberam o licopeno após a cirurgia de ovariectomia apresentaram maiores níveis de formação óssea quando comparados aos animais do grupo controle, ovariectomizados e ovariectomizados com administração de licopeno após a confecção do defeito ósseo. Estes resultados são concordes com os de Ardawi et al. (2016) e Oliveira et al. (2018) que demonstraram os efeitos benéficos do tratamento

com licopeno em ratas ovariectomizadas. Diferentemente da metodologia aplicada neste estudo, estes pesquisadores observaram os efeitos de diferentes doses de licopeno na tíbia e no fêmur, demonstrando que o efeito benéfico deste carotenoide é dose-dependente, e que a dose de 45mg/kg de peso por dia é a que apresentou os melhores resultados. Embora nesta pesquisa tenha sido utilizada a dose de 10 mg/Kg e seu efeito foi verificado em defeitos ósseos confeccionados em calvária, ficou evidente o efeito benéfico do tratamento com licopeno nas ratas ovariectomizadas que receberam o carotenoide por mais tempo. Uma possível explicação para a maior formação óssea, seria o efeito do licopeno sobre osteoblastos e sobre a atividade da fosfatase alcalina como foi demonstrado por Kim et al. (2004) em seus estudos *in vitro*. É importante ressaltar que aliada a esta ação sobre os osteoblastos, o licopeno também atua sobre os osteoclastos inibindo-os de serem formados, bem como inibindo a reabsorção óssea e a produção de espécies reativas ao oxigênio por estas células (Rao et al., 2004). O licopeno diminui a osteoclastogênese porque reprime a expressão do gene *Nfatc 1* (o regulador mestre da osteoclastogênese) e ao mesmo tempo aumenta a atividade dos osteoblastos induzindo o RNAm dos genes *Alp*, *Col1a1* e *Ocn*. Além disso o licopeno reprime as expressões dos genes *RANKL* e *OPG*, indicando que a influência do licopeno no osso em resposta à ovariectomização é parcialmente mediada pela via de sinalização do *RANK* (Ardawi et al., 2016).

Outros estudos também relatam a diminuição do estresse oxidativo após a suplementação com licopeno e que este carotenoide melhora a saúde do tecido ósseo, porém os mecanismos através do qual ele altera o metabolismo deste tecido, *in vivo*, ainda não foram elucidados (Mackinnon et al., 2011; Ardawi et al., 2016). Contrariamente, Iimura et al. (2015) verificaram que a ingestão de licopeno por ratas ovariectomizadas inibiu a reabsorção óssea significativamente, porém sem interferir nos níveis de estresse oxidativo. Portanto, para estes pesquisadores, ainda não está realmente claro que o efeito benéfico do licopeno observado *in vivo*, foi devido à redução do estresse oxidativo.

Uma outra hipótese, seria que o tratamento com licopeno aumentaria significativamente os níveis séricos de estradiol de forma dose-dependente e atenuasse os níveis elevados de hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante resultantes da remoção de estradiol em ratas OVX, indicando que o

licopeno tem um papel benéfico na regulação da função hipotalâmica-hipófise. O mecanismo ou mecanismos subjacentes a essas observações é desconhecido. No entanto, é possível que o tratamento com licopeno restitua a expressão dos receptores de estrogênio ao normal e que isso possa ser devido à restauração dos níveis de estradiol ao normal ou melhora da sensibilidade dos tecidos ao estradiol e/ou síntese através dos tecidos que o produzem (Ardawi et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, a partir dos resultados obtidos, sugere-se que a dose de 10 mg/Kg de licopeno, é benéfica em condições sistêmicas de distúrbios ósseos, como a osteoporose. Os resultados sugerem que o licopeno, quando utilizado de forma continuada, iniciando sua administração logo após a cirurgia de ovariectomia, pode ser utilizado como um coadjuvante no tratamento e prevenção da perda óssea na osteoporose.

REFERÊNCIAS

- Ardawi MS, Badawoud MH, Hassan SM, Rouzi AA, Ardawi JM, AlNosani NM, Qari MH, Mousa SA. Lycopene treatment against loss of bone mass, microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model. **Bone**. v.83, p.127-40, 2016. doi: 10.1016/j.bone.2015.10.017.
- Cicero AFG, Fogacci F, Colletti A. Food and plant bioactives for reducing cardiometabolic disease risk: an evidence based approach. **Food Funct.**, v.8, n.6, p.2076-2088, 2017. doi: 10.1039/c7fo00178a.
- E LL, Xu WH, Feng L, Liu Y, Cai DQ, Wen N, Zheng WJ. Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). **Int J Mol Med.**, v.37, n.6, p.1475-86, 2016. doi: 10.3892/ijmm.2016.2559.
- Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenia and osteoporosis. **Bone Miner.**, v.18, n.3, p.227-236, 1992.
- Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W Hoar & CP Hickman, editors. **General and Comparative Physiology**. 2.ed. New Jersey: Prentice-hall; 1975. p.260-265.
- limura Y, Satoko UA Takeda S, Kobayashi Y, Yoshida S, Ezawa I, Omi N. The protective effect of lycopene intake on bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism.**, v.33, n. 3, p.270–278, 2015.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.**, v.15, p.171–192, 1991.
- Kim L, Rao AV, Rao LG. Lycopene II--effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. **J Med Food**. v.6, n.2, p.79-86, 2003.
- Luvizotto RA, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, Yeum KJ, Ferreira AL. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. Mackinnon ES, Rao AV, Rao LG. Dietary restriction of lycopene for a period of one month resulted in significantly increased biomarkers of oxidative stress and bone resorption in postmenopausal women. **J Nutr Health Aging.**, v.15, n.2, p.133-8, 2011.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz J Biol.**, v.62, n.4, p.609-614, 2002.

Oliveira GR, Vargas-Sanchez PK, Fernandes RR, Ricoldi MST, Semeghini MS, Pitol DL, de Sousa LG, Siessere S, Bombonato-Prado KF. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. **J Bone Miner Metab.**, 2018 Oct 24. doi: 10.1007/s00774-018-0970-8.

Rao LG, Krishnadev N, Banasikowska K, Rao AV. Lycopene I--effect on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. **J Med Food.** v.6, n.2, p.69-78, 2003.

Rowles JL 3rd, Ranard KM, Smith JW, An R, Erdman JW Jr. Increased dietary and circulating lycopene are associated with reduced prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, 2017. doi: 10.1038/pcan.2017.25.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol.** v.30, n.1, p.23-38, 1966.

Yu SJ, Liu HC, Ling-Ling E, Wang DS, Zhu GX. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. **Exp Biol Med.**, v.237, p.395-406, 2012.