



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cherley Borba Vieira de Andrade

**Efeito do docetaxel e da ciclofosfamida nas alterações da matriz óssea**

Rio de Janeiro

2013

Cherley Borba Vieira de Andrade

**Efeito do docetaxel e da ciclofosfamida nas alterações da matriz óssea**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Almeida

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A553 Andrade, Cherley Borba Vieira de.  
Efeito do docetaxel e da ciclofosfamida nas alterações da  
matriz óssea. / Cherley Borba Vieira de Andrade. – 2013.  
67 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Veloso de Almeida.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-  
Graduação em Biociências.

1. Mamas – Câncer – Teses. 2. Neoplasias da mama -  
Quimioterapia. 3. Menopausa precoce. 4. Osteoporose - Teses. 5.  
Antineoplásicos – Uso terapêutico. I. Almeida, Carlos Eduardo  
Veloso de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 618.19-006.6

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,  
desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Cherley Borba Vieira de Andrade

**Efeito do docetaxel e da ciclofosfamida nas alterações da matriz óssea**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 16 de setembro de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. André Luiz Mencalha  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Samara Cristina Ferreira Machado  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nadjá Lima Pinheiro  
Universidade Gama Filho

Rio de Janeiro

2013

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Paulo (*in memorian*) e Aurelina, meu irmão Charles e minha filha Raphaelly pela compreensão nos momentos de ausência que não foram poucos, carinho e companheirismo constante em minha vida. Amo vcs;

Ao meu orientador Carlos Eduardo pela confiança no meu trabalho e pela ajuda no meu crescimento profissional;

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual. Laboratório o qual passei boa parte da minha caminhada;

Aos amigos do FISMED, que me proporcionaram conhecimento e divertimento durante esses anos de caminhada, principalmente a Profa Regina Cely por toda paciência que teve com uma bióloga tentando entender um pouco da física;

Ao professor Jorge José de Carvalho por me acolher mais uma vez em seu laboratório e pela orientação;

Ao amigo Alan Cesar por sempre estar disponível para me auxiliar, sem esquecer das várias risadas que me proporcionou;

Um agradecimento mais que especial a Bióloga Ana Lucia do Nascimento, que sempre esteve presente na minha caminhada profissional, é mais do que uma amiga é uma irmã;

Aos amigos mais que amados do Laboratório de Ciências Radiológicas: Claudia, Rubens, Leonardo, Ronaldo, Luis, Viviane, Deise, Glorimar, Jaqueline, Leslie entre outros pelo incentivo constante, pela distração proporcionada, pelas risadas, por tudo;

À amiga Samara, por sempre se dispor a me ajudar nos momentos em que mais precisei, por me dar força e conselhos nas horas mais difíceis e claro por me auxiliar nos experimentos;

À minha amiga pra vida toda, Camila, por fazer parte da minha caminhada nesses anos aqui no LCR, pelos diversos momentos de risadas, segredos e de dificuldades que passamos juntas e conseguimos vencer. Pode ter certeza que essa parceria deu certo e vai continuar por muitos anos;

À amiga de todas as horas Claudinha, um dos presentes que ganhei enquanto estive na UERJ, sempre bem humorada e com sábias sugestões, sempre me mostrando uma visão diferente da minha;

À minha querida amiga Camilla Sampaio, sempre tão divertida e solícita. Outro presente que ganhei nessa caminhada e levarei sempre comigo;

À amiga de todas as horas Márcia Gianfaldoni, obrigada por fazer parte da minha vida pessoal e profissional;

Aos meus familiares por entenderem minha ausência em vários momentos;

## RESUMO

ANDRADE, Cherley Borba Vieira de. *Efeito do docetaxel e da ciclofosfamida nas alterações da matriz óssea*. 2013. 67 f. Tese (Doutorado em Biociências Nucleares) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima para 2030, 27 milhões de casos incidentes de câncer. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, foram estimados 518.510 casos novos de câncer para os anos de 2012 e 2013. Dessa estimativa, 52.680 correspondem ao câncer de mama (CM), com um risco estimado de 52 novos casos a cada 100.000 mulheres. O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comuns no mundo todo. Hoje se sabe que o tratamento para o CM pode levar ao surgimento de diferentes efeitos adversos tardios, entre eles a osteoporose. Uma das principais causas de surgimento da osteoporose é a menopausa precoce, que ocorre através da diminuição da concentração de estrogênio sérico. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos na matriz óssea induzidos pela quimioterapia, simulando um tratamento para o CM, em ratas Wistar. Ratas Wistar, com aproximadamente 3 meses de idade, foram divididas em: grupo controle e grupo que recebeu quimioterapia com poliquimioterápico docetaxel + ciclofosfamida (TC). A quimioterapia foi administrada em 4 ciclos, com intervalo de 1 semana entre eles. Os ratos foram submetidos à eutanásia 5 meses após o término do tratamento, para que os efeitos tardios pudessem ser avaliados. Vários estudos foram conduzidos: dosagem sorológica de estradiol, ensaios histológicos através de imunohistoquímica, micro-fluorescência de Raios-X, micro-tomografia computadorizada. Além de microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Analisando os resultados obtidos em conjunto, sugere-se que a etapa inicial para o desenvolvimento da osteoporose, causada pelo poliquimioterápico TC, seja a diminuição da função ovariana. Este evento leva à diminuição da concentração de estrogênio sérico, o que causa a atrofia uterina. Concomitante a estes fatos, o TC causa redução na concentração de zinco no tecido ósseo. Estes resultados associados causam um desequilíbrio na relação osteoblastos/osteoclastos no osso. A redução do estrogênio leva à diminuição da apoptose de osteoclastos, enquanto que a redução do zinco inibe a função dos osteoblastos. Este desequilíbrio interfere no turnover do osso, de forma a aumentar a reabsorção óssea. Deste modo, o percentual de osso fica reduzido, as trabéculas tornam-se mais finas e espaçadas. O endpoint deste processo é a osteoporose. A administração dos poliquimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida em conjunto leva a diminuição da massa óssea, a adelgaçamento das trabéculas e o aumento do espaço entre elas. Estas observações sugerem que realmente as ratas tratadas com TC apresentam osteoporose. Concluímos que tanto o estrogênio quanto o zinco têm papel fundamental no desenvolvimento desta patologia após quimioterapia com TC.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Menopausa precoce. Osteoporose. Docetaxel.

## ABSTRACT

ANDRADE, Cherley Borba Vieira de. *The docetaxel and the cyclophosphamida effect at bone matrix alterations*. 2013. 67 f. Tese (Doutorado em Biociências Nucleares) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The World Health Organization (WHO) estimates for 2030, 27 million incident cases of cancer. In Brazil, according to the National Cancer Institute, there were estimated 518,510 new cases of cancer for the years 2012 and 2013. From this estimation, 52,680 will correspond to breast cancer (BC), with an estimated risk of 52 new cases per 100,000 women. BC is one of the most common cancers worldwide. Today it is known that the treatment of the BC may lead to the emergence of different late adverse effects, including osteoporosis. One of the main causes of osteoporosis is the early menopause, which occurs with decreasing the serum estrogen concentration. This study aimed to evaluate the effects on bone matrix induced by chemotherapy, simulating a treatment for BC in Wistar rats. Wistar rats, approximately 3 months old, were divided into a control group and the group receiving polichemotherapy with docetaxel + cyclophosphamide (TC). Chemotherapy was administered in 4 cycles, with an interval of 1 week between them. The rats were euthanized 5 months after the end of treatment, so that the late effects could be evaluated. Several studies were performed: dosage of serum estradiol levels, histological tests by immunohistochemistry, micro X-ray fluorescence, micro-computed tomography and also transmission and scanning electron microscopy. Analyzing the results together, it is suggested that the initial step in the development of osteoporosis caused by multidrug TC is the reduction in the ovarian function. This event leads to decreased serum concentration of estrogen, which causes uterine atrophy. Concomitant to these facts, the TC causes a reduction in the concentration of zinc in the bone tissue. These results associated cause an imbalance in the osteoblast/osteoclast ratio in the bone tissue. The reduction in estrogen leads to decreased apoptosis of osteoclasts, while the reduction of zinc inhibits osteoblast function. This imbalance affects the bone turnover in order to increase bone resorption. Thus, the percentage of bone is reduced, and the trabeculae become thinner and spaced. The endpoint of this process is osteoporosis. The administration of docetaxel and cyclophosphamide together leads to decreased bone mass in the trabecular, thinning and increasing the space between them. These observations suggest that the rats treated with TC developed osteoporosis. We conclude that both the estrogen and the zinc play a fundamental role in the development of this disease after chemotherapy with TC.

Keywords: Breast Cancer. Early menopause. Osteoporosis. Docetaxel.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |                                                                                                                                               |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 –  | Distribuição dos animais de acordo com o tratamento realizado.....                                                                            | 29 |
| Figura 1 –  | Administração dos poliquimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida.....                                                                         | 30 |
| Tabela 2 –  | Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.....                                                                                     | 32 |
| Figura 2 –  | Setup da linha de fluorescência de raio X.....                                                                                                | 37 |
| Figura 3 –  | Região selecionada em todos os fêmures, a fim de se padronizar o local a ser varrido pelo feixe.....                                          | 38 |
| Figura 4 –  | Imagem obtida no programa STEPanizer, para a realização da contagem das células marcadas com os anticorpos específicos.....                   | 40 |
| Figura 5 –  | Imagem no programa Image Pro-Plus 5.0 utilizando a ferramenta máscara para quantificação da imunomarcação para colágeno tipo I e tipo II..... | 41 |
| Figura 6 –  | Massa do útero .....                                                                                                                          | 42 |
| Figura 7 –  | Dosagem sorológica de estradiol .....                                                                                                         | 43 |
| Figura 8 –  | Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, da imunomarcação com o anticorpo catepsina K.....                                              | 44 |
| Figura 9 –  | Quantidade de osteoclastos por mm <sup>2</sup> dos grupos controle e tratado.....                                                             | 45 |
| Figura 10 – | Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, da imunomarcação com o anticorpo osteopontina.....                                             | 45 |
| Figura 11 – | Quantidade de osteoblastos por mm <sup>2</sup> dos grupos controle e tratado.....                                                             | 46 |
| Figura 12 – | Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, imunomarcação para os anticorpos colágeno tipo I e tipo II.....                                | 47 |
| Figura 13 – | Distribuição do colágeno tipo I e tipo II na matriz óssea dos grupos controle e tratado.....                                                  | 48 |
| Figura 14 – | Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, da imunomarcação pelo método TUNEL.....                                                        | 49 |
| Figura 15 – | Quantidade de núcleos apoptóticos por mm <sup>2</sup> dos grupos controle e tratado.....                                                      | 49 |
| Figura 16 – | Micrografias eletrônicas de varredura.....                                                                                                    | 50 |
| Figura 17 – | Micrografia eletrônica de transmissão.....                                                                                                    | 51 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18 – Distribuição elementar dos elementos cálcio e zinco nos grupos controle e tratado.....               | 52 |
| Figura 19 – Concentração de cálcio através da técnica de $\mu$ -XRF nos grupos controle e tratado.....           | 53 |
| Figura 20 – Concentração de zinco através da técnica de $\mu$ -XRF nos grupos controle e tratado.....            | 53 |
| Figura 21 – Razão entre volume ósseo e volume total das amostra por $\mu$ -TC nos grupos controle e tratado..... | 54 |
| Figura 22 – Separação média entre as trabéculas das amostras por $\mu$ -TC nos grupos controle e tratado.....    | 55 |
| Figura 23 – Densidade das trabéculas das amostras por $\mu$ -TC nos grupos controle e tratado.....               | 55 |
| Figura 24 – Reconstrução 3D da $\mu$ -tomografia computadorizada.....                                            | 56 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                          |                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|
| CM –                     | Câncer de Mama                                          |
| OMS –                    | Organização Mundial de Saúde                            |
| QT –                     | Quimioterapia                                           |
| CMF –                    | Ciclofosfamida, Metotrexato e Fluorouracil              |
| TC –                     | Docetaxel e Ciclofosfamida                              |
| DNA –                    | Ácido Desoxirubonucleico                                |
| FSH –                    | Hormônio Folículo Estimulante                           |
| LH –                     | Hormônio Luteinizante                                   |
| H <sup>+</sup> -ATPase – | Trifosfatase de Adenosina                               |
| M-CSF –                  | Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos             |
| RANK –                   | Receptor Ativador do Factor Nuclear - KappaB            |
| NF-kB –                  | Factor Nuclear Kappa B                                  |
| TRANCE –                 | <i>TNF-related activation-induced cytokine</i>          |
| TNF –                    | Fator de Necrose Tumoral                                |
| RANK-L –                 | Ligante do Receptor Ativador do Factor Nuclear - KappaB |
| ARF –                    | Ativação – Reabsorção - Formação                        |
| BMU –                    | Unidade Metabólica Óssea                                |
| N- (NTX-I) –             | Telopectídeos do Colágeno Tipo I Aminoterminal          |
| C- (CTX-I) –             | Telopectídeos do Colágeno Tipo I Carboxiterminal        |
| PTH –                    | Paratormônio                                            |
| DMO –                    | Densidade Mineral Óssea                                 |
| OVX –                    | Ovarectomia                                             |
| INCA –                   | Instituto Nacional do Câncer                            |
| IL1 –                    | Interleucina 1                                          |
| IL6–                     | Interleucina 6                                          |
| TNF- $\alpha$ –          | Fator de Necrose Tumoral-alfa                           |
| TGF- $\beta$ –           | Fator Transformante de Crescimento beta                 |
| MMP-9 –                  | Metaloproteinase-9                                      |
| ASCO –                   | Sociedade Americana de Oncologia Clínica                |
| $\mu$ XRF –              | Microfluorescência de Raios X                           |

|                   |                                                              |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|
| $\mu$ TC –        | Microtomografia Computadoriza                                |
| CEUA –            | Comitê de Ética em Pesquisa com Animais                      |
| UERJ –            | Universidade do Estado do Rio de Janeiro                     |
| mg –              | Miligrama                                                    |
| Kg –              | Quilograma                                                   |
| CTO –             | Centro de Terapia Oncológica de Petrópolis                   |
| ip –              | Intraperitoneal                                              |
| g –               | Grama                                                        |
| HUCFF –           | Hospital Universitário Clementino Fraga Filho                |
| UFRJ –            | Universidade Federal do Rio de Janeiro                       |
| ml –              | Mililitro                                                    |
| NaCl –            | Cloreto de Sódio                                             |
| RIA –             | Radioimunoensaio Específico                                  |
| EDTA –            | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                           |
| $\mu$ m –         | Micrometro                                                   |
| P.A. –            | Pró-Analise                                                  |
| °C –              | Graus Celsius                                                |
| PBS –             | Tampão Fosfato-Salino                                        |
| PBS/BSA –         | Tampão Fosfato-Salino/Albumina Sérica Bovina                 |
| pH –              | potencial de hidrogênio                                      |
| DAB –             | Diaminobenzidina                                             |
| TUNEL –           | Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick and Labeling |
| CO <sub>2</sub> – | Gás Carbônico                                                |
| LNLS –            | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron                       |
| GeV –             | Gigaeletron-volt                                             |
| mA –              | Miliamper                                                    |
| keV –             | Kiloeletron-volt                                             |
| mm <sup>2</sup> – | Milimetro Quadrado                                           |
| eV –              | Eletron-volt                                                 |
| Si(Li) –          | Silicio dopado com Lítio                                     |
| QXAS –            | Quantitative X-Ray Analysis Software                         |
| IAEA –            | International Atomic Energy Agency                           |
| SYRMEP –          | <i>SYnchrotron Radiation for MEDical Physics</i>             |

|         |                                                    |
|---------|----------------------------------------------------|
| BV/TV – | Razão entre Volume Ósseo e Volume Total da Amostra |
| Tb.Sp – | Separação Média entre as Trabéculas                |
| Tb.N –  | Densidade de Trabéculas                            |
| EPM –   | Erro Padrão da Média                               |
| M –     | Massa                                              |
| pg –    | Picograma                                          |
| T –     | Trabéculas                                         |
| N –     | Núcleo                                             |
| Ot –    | Osteócito                                          |
| Oc –    | Osteoclasto                                        |
| Ob –    | Osteoblasto                                        |
| µg –    | Micrograma                                         |
| 3D –    | 3 Dimensões                                        |
| MEV –   | Microscopia Eletrônica de Varredura                |
| MET –   | Microscopia Eletrônica de Transmissão              |
| IA –    | Inibidores de aromatase                            |

## SUMÁRIO

|          |                                                                     |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
|          | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                              | <b>14</b> |
| <b>1</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                   | <b>15</b> |
| 1.1      | <b>Câncer de mama.....</b>                                          | <b>15</b> |
| 1.1.1    | <u>Quimioterapia.....</u>                                           | <b>16</b> |
| 1.2      | <b>Sistema genital feminino e o ciclo reprodutivo feminino.....</b> | <b>17</b> |
| 1.3      | <b>Histologia do osso.....</b>                                      | <b>19</b> |
| 1.3.1    | <u>Remodelamento Ósseo.....</u>                                     | <b>22</b> |
| 1.4      | <b>Menopausa e seu efeito no remodelamento ósseo.....</b>           | <b>23</b> |
| 1.5      | <b>Osteoporose e CM.....</b>                                        | <b>25</b> |
| 1.6      | <b>Quimioterapia e osteoporose.....</b>                             | <b>26</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                               | <b>28</b> |
| 2.1      | <b>Objetivo geral.....</b>                                          | <b>28</b> |
| 2.2      | <b>Objetvos específicos.....</b>                                    | <b>28</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                     | <b>29</b> |
| 3.1      | <b>Animais.....</b>                                                 | <b>29</b> |
| 3.2      | <b>Administração de poliquimioterápicos.....</b>                    | <b>29</b> |
| 3.3      | <b>Eutanásia dos animais.....</b>                                   | <b>30</b> |
| 3.4      | <b>Exame físico da massa uterina.....</b>                           | <b>31</b> |
| 3.5      | <b>Dosagem sorológica.....</b>                                      | <b>31</b> |
| 3.6      | <b>Descalcificação dos ossos.....</b>                               | <b>31</b> |
| 3.7      | <b>Ensaio histológicos.....</b>                                     | <b>31</b> |
| 3.7.1    | <u>Imunohistoquímica.....</u>                                       | <b>32</b> |
| 3.7.2    | <u>Método TUNEL para apoptose.....</u>                              | <b>33</b> |
| 3.8      | <b>Processamento para microscopia eletrônica.....</b>               | <b>34</b> |
| 3.8.1    | <u>Microscopia eletrônica de varredura.....</u>                     | <b>34</b> |
| 3.8.2    | <u>Microscopia eletrônica de transmissão.....</u>                   | <b>35</b> |
| 3.9      | <b>Microfluorescência de raios X (<math>\mu</math>XRF).....</b>     | <b>36</b> |
| 3.10     | <b>Microtomografia computadorizada (<math>\mu</math>TC).....</b>    | <b>38</b> |
| 3.11     | <b>Análise dos dados.....</b>                                       | <b>39</b> |
| 3.12     | <b>Quantificação das células imunomarcadas.....</b>                 | <b>40</b> |
| 3.13     | <b>Quantificação de colágeno.....</b>                               | <b>40</b> |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                              | <b>42</b> |

|       |                                                                                                                                           |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1   | <b>Exames físicos.....</b>                                                                                                                | 42 |
| 4.1.1 | <u>Avaliação da massa uterina em reposta ao tratamento com poliquimioterapia....</u>                                                      | 42 |
| 4.2   | <b>Determinação sorológica da variação de estradiol em reposta ao tratamento com poliquimioterapia.....</b>                               | 43 |
| 4.2.1 | <u>Radioimunoensaio para Estradiol.....</u>                                                                                               | 43 |
| 4.3   | <b>Avaliação histológica da marcação de catepsina-K, Osteopontina, Colágeno-I, Colágeno-II após tratamento com poliquimioterapia.....</b> | 44 |
| 4.4   | <b>Determinação de apoptose através da metodologia de TUNEL em resposta ao tratamento com poliquimioterapia.....</b>                      | 48 |
| 4.5   | <b>Resultados da microscopia eletrônica.....</b>                                                                                          | 50 |
| 4.5.1 | <u>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</u>                                                                                     | 50 |
| 4.5.2 | <u>Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....</u>                                                                                   | 50 |
| 4.6   | <b>Análise da matriz óssea através microfluorescência de raio-X após tratamento com poliquimioterapia.....</b>                            | 51 |
| 4.6.1 | <u>Concentração dos elementos Cálcio e Zinco.....</u>                                                                                     | 52 |
| 4.7   | <b>Avaliação morfológica através da <math>\mu</math>-tomografia computadorizada após tratamento com poliquimioterapia.....</b>            | 54 |
| 5     | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                     | 57 |
|       | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                     | 61 |
|       | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                   | 62 |
|       | <b>ANEXO – Comitê de Ética.....</b>                                                                                                       | 67 |

## INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de mama em mulheres jovens vem crescendo nesses últimos anos. O tratamento quimioterápico para o câncer de mama gera vários efeitos colaterais nessas mulheres, desde a amenorreia até uma osteoporose precoce.

Desta forma, esse trabalho visa estudar a osteoporose precoce, um efeito tardio e adverso da quimioterapia. Uma vez, que se trata de uma patologia de importância significativa para saúde pública, porém não está esclarecido se o tratamento com docetaxel e ciclofosfamida provoca essa patologia, já que o docetaxel é um quimioterápico recente e quase não existem estudos retrospectivos referentes a efeitos adversos do mesmo.

Neste trabalho foram abordados os aspectos histológicos e ultraestruturais celulares, através de microscopia eletrônica, relacionados com a osteoporose provocada pela ação da quimioterapia. Para este fim, foi proposto um modelo animal com ratas Wistar, onde foi simulado o tratamento de câncer de mama com docetaxel e ciclofosfamida.

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Câncer de mama

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima para 2030, 27 milhões de casos incidentes de câncer, sendo que o maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, foram estimados 518.510 casos novos de câncer para os anos de 2012 e 2013. Dessa estimativa, 52.680 correspondem ao câncer de mama (CM), com um risco estimado de 52 novos casos a cada 100.000 mulheres (1, 2)

O CM é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sendo que no Brasil é o tipo de câncer que mais leva pacientes a óbito. O CM é relativamente raro antes dos 35 anos, mas em idade avançada sua incidência aumenta significativamente, desta forma pode-se afirmar que a idade é um dos principais fatores de risco. É consenso que a maior incidência dos tumores malignos da mama ocorra em torno dos 50 anos. Embora o aparecimento de CM em idades inferiores a 35 anos esteja mais relacionado a uma predisposição genética, nos últimos anos tem sido observado um aumento da incidência dessa doença em mulheres nessa faixa etária. Em uma incidência menor, o CM é detectado no sexo masculino. Atinge 1 homem em cada 100 mulheres diagnosticadas (3-5).

O desenvolvimento de câncer mama, assim como outras formas cânceres, não é proveniente de um único fator. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, os fatores de risco podem ser caracterizados como: não modificáveis e modificáveis. Como exemplo de fatores de risco não modificáveis tem-se: o histórico familiar (mulheres com parentes de primeiro grau - mãe ou irmã - que tiveram a doença antes dos 50 anos podem ser mais vulneráveis), o aumento da idade, a menarca precoce (primeira menstruação antes dos 11 anos de idade), a menopausa tardia (última menstruação após os 55 anos), nunca ter engravidado ou ter tido o primeiro filho depois dos 30 anos (6). Dentre os fatores de risco modificáveis estão os relacionados ao estilo de vida, como o excesso de peso e a ingestão regular (mesmo que moderada) de álcool. Além desses, a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses também pode ser considerada um fator de risco, particularmente durante a puberdade (7).

A estratégia de tratamento mais utilizada é a intervenção cirúrgica que, dependendo do estadiamento do tumor, pode ser acompanhada de quimioterapia (doxorrubicina, methotrexate, ciclofosfamida, 5-fluorouracil, dentre outras), hormonioterapia (tamoxifeno, arimidex), imunoterapia (trastuzumab) ou radioterapia (braquiterapia e teleterapia). Em geral, o tratamento do CM envolve duas ou três dessas estratégias em associação (8, 9). A cirurgia e a radioterapia se encarregam do controle da doença locorregional, o tratamento sistêmico como a quimioterapia tem como propósito reduzir a chance de recidiva à distância, ou seja, metástase (8, 10).

### 1.1.1 Quimioterapia

A quimioterapia (QT) antineoplásica, indicada em 60-70% dos casos de câncer, consiste no emprego de agentes químicos, de maneira isolada ou em combinando os agentes em um único tratamento. Essa forma de tratamento tem sido a mais indicada para o tratamento das neoplasias que são diagnosticadas em estádios avançados, apresentando ou não metástases *in situ* ou à distância (2)

A maioria dos antineoplásicos atua de forma a impedir a divisão celular através da intervenção em uma determinada etapa do ciclo celular. Comumente, opta-se pelo tratamento adotando-se a poliquimioterapia, a qual consiste na utilização de dois ou mais tipos de fármacos diferentes, buscando-se um efeito mais abrangente sobre as células tumorais (11). É importante, sempre que possível, a associação de medicações com diferentes ações, buscando o aumento do efeito antitumoral sem elevar o grau de toxicidade.

Os principais regimes de quimioterapia antineoplásica utilizados nos casos de CM são: CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil) e TC (docetaxel e ciclofosfamida). O regime de CMF é utilizado em pacientes com intolerância à doxorrubicina ou pacientes muito debilitados e idosos, com pouca expectativa de sobrevida (2).

Os taxanos surgiram na prática clínica apenas no início da década de 90, primeiro para câncer de mama metastático, e depois no tratamento adjuvante. Esses fármacos mesmo depois de 20 anos ainda são considerados novos, pois não existem muitos estudos mostrando seus efeitos colaterais em longo prazo. O docetaxel e o paclitaxel são os taxanos mais conhecidos e utilizados hoje em dia no tratamento de CM. O mecanismo de ação de ambos é idêntico, entretanto o docetaxel é, em média, 1,6 vezes mais ativo que o paclitaxel (12-15).

A principal ação dos taxanos é estabilizar os microtúbulos formados durante o processo de divisão celular impedindo sua despolimerização, a qual é fundamental na replicação celular. Além do processo de divisão celular, os microtúbulos são utilizados pelas células para formar o citoesqueleto, estrutura que confere forma a célula e auxilia no posicionamento das organelas. Os microtúbulos são estruturas dinâmicas, propriedade que auxilia na transmissão de sinais celulares, reorganização de organelas, mobilidade celular, além de intervir no processo de comunicação neuronal e secreção celular. Por todas as suas características e sua importância no crescimento celular, eles tornaram-se importantes alvos subcelulares para a atuação dos agentes quimioterápicos. Em presença do docetaxel, ocorre uma estabilização das tubulinas, principal componente dos microtúbulos, pela intercalação destes fármacos à estrutura do microtúbulo impedindo a sua despolimerização (16).

Normalmente outros quimioterápicos são utilizados em associação com os taxanos. Para o tratamento do CM são utilizados agentes alquilantes, como a ciclofosfamida. Os agentes alquilantes são fármacos que após sua ativação formam ligação covalente cruzada com as moléculas de DNA. O átomo de Nitrogênio 7 da guanina é particularmente susceptível à formação de ligação covalente com os agentes alquilantes, sendo portanto o principal alvo. Outros átomos nas bases purínicas e pirimidínicas, como os nitrogênios 1 e 3 da adenina, o 3 da citosina, e o oxigênio 6 da guanina, também podem ser alquilados, mas em menor grau. Esta alquilação promove danos a molécula de DNA que caso não sejam reparados a célula entra em apoptose (17, 18).

A ciclofosfamida não tem preferência de ação nas células tumorais, ou seja, ela também age nas células saudáveis, porém tem menos efeito sobre estas células, uma vez que elas dividem-se mais lentamente, e são mais capazes de reparar quebras de DNA quando comparadas com as células neoplásicas. A ciclofosfamida está presente em aproximadamente 90% dos casos de QT adjuvante para CM, sendo muito eficaz no tratamento do tumor, mas não na prevenção da recorrência. Esse é o principal motivo de associá-la sempre a outros fármacos, como o docetaxel (19-21).

## **1.2 Sistema genital feminino e o ciclo reprodutivo feminino**

Os órgãos do sistema genital da mulher incluem os ovários, que produzem os ovócitos secundários e hormônios, como a progesterona e estrogênios; as tubas uterinas; o útero, no

qual ocorre o desenvolvimento embrionário e fetal; a vagina; e os órgãos genitais femininos externos (22).

A formação dos gametas nos ovários é denominada de ovogênese. Esse processo, nas mulheres, começa antes do nascimento. Mensalmente, após a puberdade, as gonadotrofinas secretadas pela adeno-hipófise estimulam o recomeço da ovogênese. A menarca normalmente ocorre aos 11-13 anos, é caracterizada por estabelecer um novo ritmo gonadotrópico circadiano (24 h), ultradiano (60-90 min) e por desenvolver um feedback positivo do estrogênio que controla o ritmo infradiano (mensal). A menopausa ocorre normalmente após os 40 anos, em média aos 51-52 anos (23).

Os hormônios sexuais femininos afetam profundamente o esqueleto durante o crescimento e durante a remodelação óssea na vida adulta até a menopausa, quando a secreção de esteróides sexuais diminui, se tornando um fator dominante na rápida perda óssea que ocorre no início da menopausa. A contínua perda óssea idade-dependente na fase tardia da menopausa é devida tanto à deficiência de esteróides sexuais quanto à deficiência de vitamina D, e ao aumento da secreção de hormônio paratireoidiano (23).

Segundo Guyton (24) o ciclo reprodutivo feminino ocorre devido à secreção alternada dos hormônios gonadotrópicos folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise, e dos estrogênios e progesterona, pelos ovários.

O hormônio liberador das gonadotrofinas secretado pelo hipotálamo estimula a liberação do FSH e do LH, a partir da adeno-hipófise. O hormônio FSH causa a proliferação das células foliculares ovarianas e estimula a secreção de estrógeno, pelos folículos ovarianos em crescimento. O hormônio LH aumenta ainda mais a secreção das células foliculares estimulando a ovulação e, em seguida, promove a formação do corpo lúteo. Este secreta estrogênio e progesterona (25).

O ciclo ovariano dura, em média, 28 dias, podendo ser dividido em três fases distintas. A fase folicular inicia-se no primeiro dia da menstruação e dura entre nove e 23 dias; a fase ovulatória pode durar até três dias e a fase lútea vai do fim da ovulação até o início do fluxo menstrual (26, 27). Alguns autores levam em conta apenas as fases folicular e lútea, inserindo a fase ovulatória como uma etapa tardia dentro da fase folicular. Cada uma dessas fases caracteriza-se por um número específico de dias e por perfis específicos de concentrações séricas dos hormônios sexuais (28, 29).

Na fase folicular e ovulatória, grandes quantidades de estrogênio são secretadas, enquanto na fase lútea ocorre o predomínio de progesterona e, em menor grau, do estradiol. A fase lútea caracteriza-se pelo aumento acentuado dos níveis séricos de progesterona,

alcançando o seu pico máximo logo após a ovulação e que são responsáveis pelo aumento da temperatura corporal basal observada nesta fase. Simultaneamente, o estrogênio sérico volta a aumentar nessa fase, após redução importante durante a ovulação. Nos últimos dias do ciclo ovariano, o corpo lúteo vai-se degenerando e os níveis de progesterona e estrogênio caem, provocando o início do fluxo menstrual e um novo ciclo se repete (28, 29).

O estrogênio circulante no plasma e a progesterona, em menor extensão, atuam diretamente no esqueleto através de receptores destes dois hormônios nas células ósseas. O estrogênio diminui reabsorção óssea e aumenta a formação óssea em mulheres da puberdade à menopausa. A progesterona não demonstrou ter atividade anti-reabsortiva após a menopausa, porém ela estimula a formação óssea quando combinada com estrogênio em terapia hormonal (23).

Em ratas o ciclo hormonal funciona de maneira similar a outros políestricos, porém mais curta. As fases podem ser divididas em: metaestro, diestro, proestro e estro. A ovulação ocorre desde o início do proestro até o final do estro. Durante o ciclo estral, prolactina, LH e FSH permanecem baixos e aumentam ao final da fase de proestro. Os níveis de estradiol começam a aumentar no metaestro, atingindo níveis máximos durante o proestro e retornando aos valores basais no estro. A Secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro, com uma diminuição no final. Então, o valor da progesterona aumenta para atingir o seu segundo pico no final do proestro. A caracterização de cada fase é baseada na proporção entre três tipos de células observadas no esfregaço vaginal: células epiteliais, células queratinizadas e leucócitos (30). Em relação ao útero das ratas, ele se apresenta rosado e preenchido por fluidos durante o estro, tornando-se fino e anêmico no diestro. Durante o proestro, novos folículos se formam e o útero novamente aumenta de volume em preparação para uma possível implantação durante o estro seguinte. Quando as ratas entram na menopausa há uma atrofia do útero, com consequente perda de massa, e essa fase é denominada anestro (30).

### 1.3 Histologia do Osso

O osso é composto de diversos tecidos atuando em conjunto: tecido ósseo, cartilagem, tecido nervoso, adiposo, tecidos conjuntivos densos e epitélio. Por essa razão cada osso individual é considerado um órgão. O tecido ósseo é um tecido conjuntivo rígido, inflexível

e resistente. Estas características são provenientes da combinação de pirofosfato de cálcio e carbonato de cálcio (formando a hidroxiapatita), com quantidades menores de magnésio, Zinco, flúor, sulfato, sódio e cloro necessários para a manutenção da homeostasia mineral, combinado com o colágeno. O osso é altamente vascularizado e metabolicamente ativo. Suas funções são suporte e proteção para o corpo e seus órgãos, além de um reservatório para íons de cálcio e fosfato (31, 32).

De acordo com sua macro aparência o osso pode ser dividido em osso compacto e osso esponjoso:

O osso compacto ou cortical contém poucos espaços, sendo encontrado na superfície exterior de todos os ossos. Está disposto em unidades chamadas ósteons ou sistemas de Havers. A sua principal função é a de conferir rigidez ao osso, dependendo a sua proporção relativa, da função e solicitação mecânica do respectivo osso (32).

O osso esponjoso está localizado na porção interior do osso. Ele consiste numa estrutura reticular porosa, com lamelas dispostas em uma treliça irregular de finas colunas de ossos chamadas trabéculas de densidade variável e relativamente baixa, que confere flexibilidade e resistência à estrutura óssea global. Estas propriedades advêm da sua capacidade de absorção de energia proveniente de impactos (32).

No tecido ósseo estão presentes quatro principais tipos de células: as células osteogênicas, os osteoblastos, os osteócitos e osteoclastos. As células osteogênicas são células-tronco não especializadas, derivadas do mesênquima, o tecido a partir do qual todos os tecidos conjuntivos são formados. Os osteoblastos são células unicelulares com forma cúbica ou colunar e de aparência epitelial, formando uma monocamada que recobre todos os locais de formação óssea. Eles são altamente polarizados e depositam a osteóide, que é a matriz orgânica não mineralizada do osso ao longo da interfase osteoblasto-osso. Os osteoblastos são os responsáveis por iniciar e controlar a mineralização subsequente da osteóide (31).

Os osteoblastos são células ativamente engajadas na síntese de proteína, na glicolização e na secreção, sendo seus produtos específicos o colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. Quando a formação óssea está completa, os osteoblastos se achatam e se diferenciam em osteócitos, que são células maduras ou terminalmente diferenciadas da linhagem osteoblástica que mantém a matriz extracelular do osso (31).

Os osteoclastos são derivados da linhagem celular progenitora de monócito-macrófago da medula óssea, que desvia para a via progenitora osteoclástica. Os monócitos são os precursores dos osteoclastos, que ao atingirem o osso através da circulação sanguínea

se funde em células multinucleadas com até 30 núcleos. Essa formação de monócitos em osteoclastos é mediada por osteoblastos e pelas células do estroma da medula óssea (31, 33).

Os osteoclastos aderidos a matriz óssea liberam enzimas lisossômicas e ácidos necessários para a reabsorção óssea. Esta envolve primeiro a dissolução dos componentes inorgânicos do osso mediada pela  $H^+$ -ATPase (trifosfatase de adenosina), seguida da degradação enzimática do componente orgânico por uma protease lisossomal, a catepsina K (31, 33). Este processo de reabsorção óssea é parte do desenvolvimento, crescimento, maturação e reparo normal do osso.

Osteoclastogênese é um fenômeno complexo, facilitado pela integração dos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos com as células do estroma da medula óssea (células estromais). O estroma da medula óssea é morfologicamente heterogêneo e incluem fibroblastos, células osteogênicas e adipócitos. Existem evidências que essas células são derivadas de uma célula de origem única pluripotente que dá origem a progenitores de diferentes células mesenquimais (osteoblastos, adipócito, mioblasto, condroblasto e fibroblasto) (33).

As células estromais da medula óssea contribuem para osteoclastogênese, fornecendo um suporte físico para os osteoclastos como também pela produção de fatores de membrana solúveis e citocinas que estimulam a proliferação e/ou diferenciação dos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos. Células estromais ou osteoblastos que induzem a formação do osteoclasto devem ter capacidade de produzir o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (33).

Existe um fator produzido pelas células estromais que é crítico para a formação de osteoclastos, o RANK ligante (ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B), também conhecido como TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*) que é um membro da família TNF. Yasuda e colaboradores (34) mostraram que a maioria dos fatores osteotrópicos que induzem a formação de osteoclasto agem indiretamente se ligando a células estromais da medula óssea, que por sua vez induzem um aumento da expressão de RANK ligante, que então se liga ao receptor de RANK-L no precursor de osteoclasto e induz a formação de osteoclasto (33).

### 1.3.1 Remodelamento Ósseo

A remodelação óssea é um processo ativo que ocorre em todo o esqueleto, ao longo da vida, permitindo que o mesmo seja continuamente renovado. Ocorre por meio de dois ciclos intimamente acoplados (reabsorção e formação), determinados pela sequência conhecida como ARF: ativação - reabsorção - formação. Após a ativação, os osteoclastos formam a lacuna de reabsorção. Uma vez terminada essa fase, os pré-osteoblastos migram para a cavidade, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a formação da matriz óssea. A mineralização da matriz somente ocorre vários dias após sua síntese e, durante esse processo, alguns osteoblastos serão enclausurados, transformando-se em osteócitos. À esse conjunto de células ósseas e o osso novo formado dá-se o nome de unidade metabólica óssea (do inglês, BMU) (35-38).

O colágeno tipo I é o maior componente orgânico da matriz óssea, corresponde a 95% da mesma (39). Durante a quebra do colágeno, fragmentos de telopeptídeos N- (NTX-I) e C- (CTX-I) terminais são liberados na circulação. A determinação da concentração destes telopeptídeos pode indicar alterações no metabolismo ósseo, independente da causa (40).

As mudanças na massa óssea são causadas por um desequilíbrio da remodelação óssea, que pode ser reversível ou não. Este desequilíbrio pode ocorrer, por exemplo, devido a alterações metabólicas oriundas do recebimento de uma determinada dose de radiação pelo organismo. Quando o número de BMUs aumenta, as novas cavidades de reabsorção surgem antes que a formação no interior delas se complete, causando diminuição da massa óssea, tanto em osso cortical (aumento da porosidade) quanto em trabecular (afilamento, perfuração e perda da conectividade das trabéculas). Esse processo pode ser reversível quando cessarem as causas que o provocaram. A persistência do mesmo pode alterar a micro-arquitetura óssea e comprometer, de maneira irreversível, a função mecânica do esqueleto (35, 36).

Vários fatores sistêmicos estão relacionados com a homeostase do tecido ósseo, dentre eles podemos citar o paratormônio (PTH), a calcitonina, os glicocorticóides e o estrogênio, todos esses são importantes para a regulação do metabolismo ósseo (41-43). Alguns autores acreditam que, com exceção da calcitonina, os demais atuam sobre os osteoblastos, os quais por meio da liberação de fatores locais interferem na formação, na atividade e na sobrevivência de osteoclastos (42, 44). Dentre os fatores sistêmicos, o

estrogênio apresenta grande importância para a homeostase do tecido ósseo, visto que a queda nas taxas do mesmo está relacionada à ocorrência de osteoporose (44, 45).

#### 1.4 Menopausa e seu efeito no remodelamento ósseo

A menopausa está associada com o início da rápida perda óssea nas mulheres devido à diminuição da função ovariana, que leva à diminuição da secreção de estrogênio. Durante a menopausa o nível de  $\beta$ -estradiol plasmático diminui em 85-90% do nível médio presente na pré-menopausa. A reabsorção óssea aumenta em aproximadamente 90% após a menopausa, enquanto que a formação óssea aumenta em torno de 45%. A diferença entre reabsorção e formação óssea favorece a reabsorção, o que leva a uma perda óssea acelerada durante os primeiros 8-10 anos após menopausa. O aumento da reabsorção óssea leva ao efluxo de cálcio dos ossos para o sangue (23).

A menopausa está fortemente associada ao remodelamento ósseo, e há consequentemente um aumento de 50 a 100% de aminoterminal (NTX) e carboxiterminal (CTX-I), que são telopeptídeos de colágeno I, derivados de sua degradação. Um estudo prospectivo, desenvolvido por Hermann et al. (46), mostrou que durante a transição para a menopausa, inicialmente ocorrem alterações no remodelamento ósseo levando a diminuição da formação óssea que posteriormente é seguida por um aumento na reabsorção óssea. Estudos mostraram que a concentração na urina de NTX-I esta significativamente elevada em mulheres na pós-menopausa quando comparado com a pré-menopausa. Diminuição da massa óssea e rápida perda óssea mostraram-se fatores preditores de futuras fraturas ósseas (40).

O estrogênio diminui a reabsorção óssea e aumenta a formação óssea em mulheres da puberdade a menopausa(47). Este hormônio causa um importante aumento na densidade mineral óssea (DMO) que se inicia na menarca, tendo um pico na densidade aos 25-35 anos. Os efeitos fisiológicos de outros hormônios reprodutores femininos no esqueleto ainda não estão claros (23).

O declínio da função ovariana na menopausa resulta em diminuição da produção de estrogênio e um aumento paralelo do FSH. O efeito combinado da privação de estrogênio e elevação de FSH causa uma estimulação da reabsorção óssea num período de rápida perda óssea que é essencial no desenvolvimento de osteoporose na pós-menopausa. Essa fase

inicial da perda óssea é seguida por uma prolongada perda de osso cortical devido ao incompleto preenchimento das cavidades reabsorvidas, em razão da diminuição da atividade dos osteoblastos. O aumento da quantidade de osteoclastos é o mecanismo chave pelo qual a perda óssea ocorre, inicialmente após ovariectomia (OVX) (48).

O remodelamento ósseo é influenciado pela redução da produção de estrogênio endógeno através da indução de menopausa precoce ou da inibição da atividade da aromatase no caso de mulheres na pós-menopausa. A aromatase é uma enzima responsável por catalisar a conversão dos andrógenos em estrogênios (49).

A deficiência estrogênica promove perda óssea em decorrência do desequilíbrio da remodelação óssea, que determina maior absorção em relação à neoformação óssea (50). A deficiência de estrogênio aumenta a ativação do receptor de RANKL que leva ao aumento do recrutamento e ativação de osteoclastos e diminuição de apoptose dos mesmos. A presença de estrogênio modula a produção de outras citocinas que por sua vez controlam a atividade dos osteoclastos de forma parácrina. O estrogênio suprime a produção de citocinas de reabsorção óssea como interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e prostaglandinas. O estrogênio também aumenta a produção de fator transformante de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) que induz apoptose de osteoclastos, o estrogênio estimula diretamente a apoptose de precursores de osteoclastos e algumas evidências sugerem que o aumento do FSH sérico cause perda óssea independente dos níveis de estradiol séricos (23). Enquanto a presença de estrogênio estimula apoptose dos osteoclastos, nos osteoblastos e osteócitos o efeito é inverso (48). O estrogênio também impede a degradação da matriz óssea, devido sua atuação sobre a catepsina K e a MMP-9 (metaloproteinase-9), que são proteases produzidas por osteoclastos (51).

Parte das mulheres com CM têm sido diagnosticadas e tratadas precocemente e tem ocorrido um aumento no tempo de sobrevida, a osteoporose poderá ser diagnosticada com mais frequência nessas mulheres. Porém os mecanismos de ação do estrógeno sobre o tecido ósseo não estão completamente elucidados.

## 1.5 Osteoporose e CM

Osteoporose na pós-menopausa é uma desordem heterogênea caracterizada por perda óssea progressiva com início pós-menopausa natural ou cirúrgica, levando a ocorrência de fraturas 15-20 anos após a interrupção da função ovariana. As mulheres perdem densidade mineral óssea (DMO) a uma taxa relativamente baixa que se inicia aos 40 anos e esta taxa de perda aumenta rapidamente com o início da menopausa no fim dos 40 e início dos 50 anos. Mulheres na pós-menopausa perdem de DMO trabecular rapidamente nas vértebras, pélvis e punho, e existe uma rápida perda de osso cortical em ossos longos e nas vértebras após a menopausa. Aproximadamente 8-10 anos após a menopausa, a baixa perda óssea relacionada à idade começa a ficar proeminente e continua até o fim da vida (23).

Os efeitos da osteoporose são maiores nos ossos longos, como o fêmur, ou nos osso da coluna. Apesar disso, alguns estudos demonstram que ocorre perda óssea sistêmica devido à deficiência estrogênica (44). Um dos mais importantes parâmetros da osteoporose é o diâmetro da porosidade óssea, através do qual é possível caracterizar as mudanças estruturais (52-54).

Um estudo randomizado com 96 pacientes de CM que receberam CMF mostrou que mulheres amenorreicas tiveram perda de 6,4% de DMO na coluna vertebral e 5,2% da DMO no quadril após 1 ano, quando comparado com a perda de 1,6% e 3,1% da DMO na coluna vertebral e quadril em pacientes que menstruaram. Nota-se que mesmo nas mulheres que mantiveram seu período menstrual ainda ocorreu perda da DMO (38, 49).

Outro estudo conduzido por (55) comparou a perda de DMO em 148 mulheres na pré-menopausa com CM e tratadas com CMF. Os resultados mostraram que houve uma perda de 9,5% da DMO na coluna vertebral e 3,9% no colo do fêmur nas pacientes amenorreicas, comparado com 0,3% da DMO na coluna vertebral e nenhuma alteração da DMO no colo do fêmur nas pacientes com ciclo menstrual.

Considerando que a perda média da DMO após menopausa natural é de 1-2% por ano, as perdas reportadas nos estudos são maiores e indicam preocupação em relação ao risco de fraturas em sobreviventes do CM, embora não existam estudos sobre fraturas nessas pacientes. E a influência no osso durante regimes quimioterápicos que incluem taxanos é desconhecida (38, 49, 56).

Mulheres com CM tratadas com quimioterapia têm um risco aumentado de desenvolver osteoporose e fraturas. O ideal é detectar a perda óssea prematuramente e fazer

a intervenção apropriada para reduzir esse risco. Desta forma torna-se necessário desenvolver estratégias que determinem a taxa de perda óssea, estimem o risco de fraturas e monitorem os efeitos do tratamento. A sociedade americana de oncologia clínica (ASCO, 2003) publicou um guia para o monitoramento e tratamento de perda óssea associado ao tratamento de CM. O guia sugere que pacientes em grupo de risco para osteoporose e fraturas sejam avaliadas por densitometria óssea para verificação da DMO e que pacientes com T-score abaixo de -2,5 devem ser tratadas com biofosfanatos (49, 57). Os biofosfanatos são potentes agentes de anti-reabsorção. Eles inibem a reabsorção óssea pelos osteoclastos, preservando o tecido ósseo, aumentando a massa óssea e reduzindo o risco de fraturas (37, 49)

A absorção de cálcio intestinal é estimulada pelo estrogênio e pela vitamina D. A privação de estrogênio reduz a absorção intestinal de cálcio, e se a quantidade suficiente de cálcio não é suprida na dieta, isso resultará em um balanço negativo de cálcio. Consequentemente isso acarretará hiperparatireoidismo secundário, aumento do remodelamento ósseo, diminuição da DMO e aumento do risco de fraturas. Como a absorção intestinal é dependente de vitamina D, está também deverá ser suprida (37, 49, 58).

## **1.6 Quimioterapia e Osteoporose**

Dos mais de 200.000 novos casos de câncer da mama nos Estados Unidos em cada ano, 25% ocorrem antes da menopausa. Nestas mulheres, a menopausa induzida por quimioterapia, a ablação dos ovários, e terapia hormonal, todos contribuem para a perda óssea acelerada(59). Embora as taxas de mortalidade por câncer de mama têm diminuído nos últimos anos, os efeitos secundários relacionados com o tratamento a longo prazo tem um efeito negativo considerável na morbidade e risco não relacionado a mortalidade por câncer (60).

Mais jovens sobrevivem ao câncer de mama e elas correm o risco de sequelas como a menopausa precoce(61). A quimioterapia tem sido relatada por induzir a falência ovariana prematura relacionada à idade em mulheres que estão na pré-menopausa, no momento de seu diagnóstico de câncer de mama, que afeta 13% a 77% das mulheres com menos de 40 anos, e 57% a 98% das mulheres com mais de 40 anos(62).

A menopausa é um tempo especialmente vulnerável durante o qual as mulheres sofrem uma aceleração de perda de massa óssea que é mais aparente durante a década subsequente e que é responsável por perda de osso esponjoso de 20% a 30% e as perdas de osso cortical de 5% a 10%. Esta rápida perda óssea pode ser totalmente evitada, se os estrogênios são prontamente substituídos, mas só pode ser pobremente recuperado depois de ter ocorrido a perda óssea. (63).

Vários estudos confirmaram um maior risco de perda óssea em mulheres na pré-menopausa submetidas a quimioterapia para CM. Entre as 27 mulheres na pré-menopausa tratadas com ciclofosfamida, doxorrubicina e fluorouracil, 41% deixaram de menstruar durante o tratamento e ocorreu uma redução de densidade mineral óssea (DMO), 14% menor do que nas mulheres que permaneceram na pré-menopausa, e 7% tiveram um DMO menor do que seria esperado para uma mulher de 55 anos(62).

O esquema CMF é usado em pacientes com intolerância ao doxorrubicina ou pacientes muito debilitados e idosos, com pouca expectativa de sobrevivência.. A influência sobre o osso durante os regimes de quimioterapia que incluem os taxanos, como o docetaxel, é desconhecida(64, 65). Estes fármacos, infelizmente, têm sido mostrados por causar a menopausa prematura, e, conseqüentemente, aumenta a perda de massa óssea, que podem conduzir à osteoporose(66).

A maioria dos agentes quimioterapêuticos reduzem a DMO e aumentam o risco de fraturas por causar da supressão gonadal, que por sua vez aumenta a reabsorção óssea. Os locais comuns para DMO a serem medidos são o colo do fêmur, quadril total e coluna lombar, porque seus DMOs são significativamente mais baixos (60, 67)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este projeto teve o objetivo de avaliar e comparar os efeitos induzidos pela administração de docetaxel e ciclofosfamida no processo de osteoporose induzida por uma menopausa precoce em ratas Wistar (*Rattus norvegicus*).

### 2.2 Objetivos específicos

- Fazer dosagem sérica do estradiol a fim de confirmar a menopausa nos animais e com isso correlacionar a baixa dosagem do hormônio com alterações na matriz óssea.
- Quantificar os osteoclastos e osteoblastos através de anticorpos específicos para analisar a dinâmica do remodelamento ósseo
- Analisar a distribuição dos colágenos I e II nos ossos, além de colorações específicas para cartilagem a fim de verificar se houve modificação na estrutura óssea que possibilite uma maior fragilidade da mesma.
- Avaliar a ultraestrutura dos osteoclastos dos grupos tratados.
- Verificar a distribuição espacial dos elementos cálcio e zinco nos ossos através da técnica de Microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF)
- Verificar a estrutura tridimensional e fazer a quantificação das trabéculas ósseas através da microtomografia computadorizada ( $\mu$ TC).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade aproximada de três meses (jovens adultas), pesando entre 190 e 210 gramas foram mantidas em biotério, com ciclo de luminosidade e temperatura controladas. Os animais permaneceram em gaiolas de plástico apropriadas, contendo serragem, e receberam água potável e ração *ad libitum*. Os animais tiveram massa corporal aferida semanalmente durante todo o experimento. Conforme pode ser observado na tabela 1, as ratas foram divididas em diferentes grupos, cada um contendo 10 ratas. Esse número foi adotado em virtude do tamanho de amostra ser suficiente para se testar a normalidade dos dados, dentro de cada amostra e, dessa forma, se escolher o teste estatístico apropriado para análise dos resultados. A distribuição dos animais, nos diferentes grupos experimentais, foi realizada de forma randômica. Os animais foram manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UERJ, através do processo de número CEUA/010/2012.

Tabela 1 - Distribuição dos animais, de acordo com o tratamento realizado.

| <b>Grupos</b> | <b># Animais</b> | <b>Tratamento</b>     |
|---------------|------------------|-----------------------|
| Controle      | 10               | Controle              |
| TC            | 10               | Poliqumioterapia (TC) |

#### 3.2 Administração de poli-quimioterápicos

Nos grupos específicos, o poli-quimioterápico (TC), combinando ciclofosfamida + docetaxel, foi administrado pela via intraperitoneal (ip), com os animais previamente anestesiados com ketamina/xilazina (1ml/g). Foram realizados 4 ciclos TC, com intervalo de 7 dias entre eles. Cada animal recebeu 50mg/Kg de ciclofosfamida e 12,5 mg/Kg de docetaxel. A figura 1 mostra um animal recebendo o quimioterápico docetaxel. A dose

administrada para cada uma das drogas, em cada ciclo, foi calculada adequadamente para ser equivalente à dose por ciclo de quimioterapia em humanos (68). O Grupo controle recebeu volume de solução NaCl 0,9% equivalente ao volume de quimioterápico, também em 4 ciclos espaçados por 7 dias. A quimioterapia nos animais foi realizada no Centro de Terapia Oncológica (CTO), em Petrópolis, RJ.

Figura 1. Animal do grupo TC recebendo quimioterapia.



### 3.3 Eutanásia dos animais

Após a poliquimioterapia, os animais retornaram às caixas de origem e permaneceram sob observação constante até a data da eutanásia (5 meses após o tratamento), com 9 meses de idade. No dia da eutanásia os animais foram anestesiados Ketamina/Xilazina (1ml/g) e pesados.

### **3.4 Exame Físico da Massa Uterina**

Foram mensurados os pesos dos úteros em balança de precisão (Digipeso DP-3000, Denver Instrument AA- 160). Os úteros foram pesados diretamente na balança, e também pelo método de Scherle, para a obtenção do volume. A relação como massa útero/massa corporal foi feita.

### **3.5 Dosagem Sorológica**

As dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio específico (RIA) em amostras de soro obtidas de todos os animais do estudo. Todas as análises de estradiol (MP Biomedicals, Inc., CA, USA) foram executadas em duplicata, conforme indicação do fabricante. A detecção da radioatividade foi efetuada em contador gamma (Gamma-C12, USA). As concentrações plasmáticas desses hormônios foram expressas em pg/mL.

### **3.6 Descalcificação dos ossos**

Após a fixação com karnovsky do fêmur por 72 horas, os mesmos foram lavados por 2 horas em água corrente para retirada do excesso de fixador. Depois da lavagem os ossos foram colocados em EDTA pH 8,0 para a realização da descalcificação gradativa do osso. Foi realizada troca diária do EDTA, a fim de agilizar o processo de descalcificação, que terminou após 3 meses.

### **3.7 Ensaios histológicos**

Os ensaios histológicos foram realizados através de microscopia de luz, para tal foi utilizado processamento de rotina, que será descrito a seguir. Após a descalcificação conforme citada no item 3.6 os fêmures foram desidratados em séries crescentes de álcoois,

diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados em cortes de 5 µm de espessura em micrótomo, marca Microm modelo HM 325. As imagens digitais foram adquiridas usando a câmera microscópica de alta resolução Zeiss AXIOCAM HRc (Jena, Alemanha), acoplada ao microscópio Zeiss AXIO SCOPE A.1 (Jena, Alemanha).

### 3.7.1 Imunohistoquímica

Foi realizada imunohistoquímica para anticorpos específicos, tabela 2. Essa técnica foi utilizada devido sua especificidade com os antígenos de interesse.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.

| ANTICORPO    | DILUIÇÃO | FABRICANTE               | CÓDIGO     |
|--------------|----------|--------------------------|------------|
| Catepsina K  | 1:100    | Abcam                    | Ab - 19027 |
| Osteopontina | 1:100    | Abcam                    | Ab – 8448  |
| Colágeno I   | 1:200    | Abcam                    | Ab – 292   |
| Colágeno II  | 1:200    | Santa Cruz Biotechnology | Sc – 52658 |

Os cortes de fêmures foram processados conforme citado no item 3.8, e não foram corados. As lâminas montadas primeiramente passaram pelo processo de desparafinização, que consiste na retirada da parafina (para que as soluções utilizadas posteriormente pudessem infiltrar-se no material), para isso ficaram por 30 minutos em estufa a 37°C e passaram por 3 banhos em xileno (por 2 minutos cada). Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes (100%, 90% e 70%) de álcool etílico P.A. e água destilada (todos os banhos tiveram a duração de 2 minutos). Após o banho de água destilada, as lâminas foram transferidas para câmara úmida. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 15 minutos, através do peróxido de hidrogênio a 3%. A retirada do excesso de peróxido de hidrogênio a 3% foi realizada com 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. Foi realizada recuperação antigênica, onde as lâminas ficaram imersas na solução tampão tripsina pH 8,0 a 60°C. O excesso foi retirado através de 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. A reação das amostras com PBS/BSA a 3% por 20 minutos foi realizada para que ocorresse o bloqueio de sítios inespecíficos. Após este intervalo de tempo ocorreu a incubação da amostra com o anticorpo primário específico, diluído na proporção citada na tabela 3, em PBS/BSA a 1%, overnight a 4°C. Após este período o excesso de

anticorpo primário foi retirado com 3 banhos em tampão PBS, de 5 minutos cada. Seguidamente foi realizada a incubação do anticorpo secundário, conjugado com biotina (DAKO®, K400611, Califórnia, USA) durante 30 minutos, e retirado o excesso do anticorpo secundário através de 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada.

A posterior incubação com streptavidina (DAKO®, K400611, Califórnia, USA), por 20 minutos, foi realizada para que essa conjugasse com a biotina do anticorpo secundário, e com isso amplificasse o sinal da reação antígeno-anticorpo. Passado esse intervalo o excesso de streptavidina foi retirado por lavagem única em tampão PBS. Após essa lavagem foi aplicado uma gota de DAB (DAKO®, K400611, Califórnia, USA), durante 20 segundos, para evidenciar a reação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização da mesma ao microscópio de luz. A reação com o DAB foi interrompida através da colocação das lâminas em água destilada. O material foi contra corado com hematoxilina por 1 minuto. Após a contra coloração as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA), e visualizadas com o equipamento descrito no item 3.8.

### 3.7.2 Método TUNEL para apoptose

Para avaliação de apoptose foi utilizada a avaliação de TUNEL. Esta metodologia se baseia na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com *digoxigenin* na região livre 3'OH das quebras do DNA de fita simples ou fita dupla. Essa reação é catalisada por uma enzima denominada de *terminal deoxynucleotidyl transferase* que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA. Os fragmentos de DNA marcados com os nucleotídeos marcados com *digoxigenin* irão se ligar a um anticorpo *anti-digoxigenin* que está conjugado a uma peroxidase que gerará uma reação permanente que será visualizada através de cromógenos específicos. Para a realização desse método foi utilizado o kit ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, MA, USA)

Os cortes de fêmures foram processados conforme citado no item 3.7, e não foram corados. As lâminas montadas primeiramente passaram pelo processo de desparafinização, que consiste na retirada da parafina (para que as soluções utilizadas posteriormente pudessem infiltrar-se no material), para isso ficaram por 30 minutos em estufa a 37°C e passaram por 3 banhos em xileno (por 2 minutos cada). Após a desparafinização, os cortes foram hidratados

com banhos decrescentes (100%, 90% e 70%) de álcool etílico P.A. e água destilada (todos os banhos tiveram a duração de 2 minutos). Após o banho de água destilada, as lâminas foram transferidas para câmara úmida. A permeabilização da membrana nuclear foi realizada através de dois pré-tratamentos, um com Triton (Sigma-Aldrich, MA, USA) 100x 0,1% em 0,1% de citrato de sódio por 2 minutos no gelo e outro com proteinase K (Sigma-Aldrich, MA, USA) por 15 minutos, entre os pré-tratamentos foi realizado 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 15 minutos, através do peróxido de hidrogênio a 3%. A retirada do excesso de peróxido de hidrogênio a 3% foi realizada com 2 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. Foi utilizado o *Equilibration Buffer* (fornecido pelo fabricante) por 10 minutos. Após esse período foi incubado o anticorpo primário TDT (deoxynucleotidyl transferase) em câmara umidificadora a 37°C por 1 hora. Posteriormente utilizou-se o *Stop/Wash Buffer* (fornecido pelo fabricante) por 10 minutos, a retirada do excesso do tampão foi feita através de 3 banhos em tampão PBS de 1 minuto cada. Seguidamente foi realizada a incubação com o anticorpo secundário *anti-digoxigenin* durante 1 hora, e retirado o excesso do anticorpo secundário através de 3 banhos em tampão PBS de 2 minutos cada. Após essas lavagens foi aplicada uma gota de DAB (DAKO®, K400611, Califórnia, USA), durante 20 segundos, para evidenciar a reação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização da mesma ao microscópio de luz. A reação com o DAB foi interrompida através da colocação das lâminas em água destilada. O material foi contra corado com hematoxilina por 1 minuto. Após a contra coloração as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA), e visualizadas com o equipamento descrito no item 3.8.

### 3.8 Processamento para microscopia eletrônica

#### 3.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As epífises de fêmur após passarem pela descalcificação conforme citado no item 3.6 passaram por 3 banhos em tampão cacodilato de 15 minutos cada. Foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio durante 60 minutos. Posteriormente ocorreu uma nova etapa de 3 banhos com tampão Cacodilato por 15 minutos

cada. Decorrido os banhos foi realizada uma etapa de desidratação das amostras através de banhos de 30 minutos em concentrações crescentes de acetona P.A. (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%).

A partir da desidratação foram realizadas as etapas de ponto crítico (que consiste na substituição do solvente por CO<sub>2</sub>) no aparelho Critical Point Dryer CPD2 e metalização (realização de uma camada fina de material condutor) no aparelho Sputter Coater 108 Cressington. Após essas etapas o material foi visualizado no microscópio eletrônico de varredura LEO 1450 VP.

### 3.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As epífises de fêmur após passarem pela descalcificação conforme citado no item 3.6 passaram por 3 banhos em tampão cacodilato de 15 minutos cada. Foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio durante 60 minutos. Posteriormente ocorreu uma nova etapa de 3 banhos com tampão Cacodilato por 15 minutos cada. Decorrido os banhos foi realizada uma etapa de desidratação das amostras através de banhos de 30 minutos em concentrações crescentes de acetona P.A. (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%). Após a etapa de desidratação ocorre o processo de infiltração da resina EPOXI no material, através de banhos em concentrações crescentes da resina EPOXI e acetona P.A. (1:2; 1:1 e 2:1, respectivamente) por 2 horas cada. Posteriormente é realizado 2 banhos de resina pura, onde o primeiro dura 6 horas e o segundo overnight, após isso inclui-se o material em formas de silicões com a resina e leva-se à estufa por 48 horas para ocorrer a polimerização da resina.

Após a polimerização são realizados os cortes semifinos (Leica Microsystems - USA), para escolha da região a ser analisada, em seguida são feitos cortes ultrafinos (Leica Microsystems - USA), esses cortes são contrastados com acetato de uracila e nitrato de prata, posteriormente visualizados no microscópio eletrônico Carl Zeiss do Brasil modelo EM 906.

### 3.9 Microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF)

As medidas de microfluorescência de raios X foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP, Brasil, na linha D09B-XRF. A linha de XRF destina-se à análise da composição química multielementar ( $Z \geq 13$ ), em aplicações científicas de determinação de elementos traços em ciências ambientais, biológicas e de materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico. As principais características do equipamento são listadas a seguir:

- ✓ Campo magnético do dipolo D09B: 1,65 T;
- ✓ Anel de armazenamento de elétrons: 93,2 m de perímetro, e 30 m de diâmetro;
- ✓ Energia do elétron no anel de armazenamento: 1,37 GeV ( $i = 100$  mA);
- ✓ Fluxo de fótons a 8 keV e área de 20 mm<sup>2</sup>: 4,2x10<sup>9</sup> fótons/s;
- ✓ Feixe branco (policromático dentro da faixa de raios X) ou seleção de energia entre 4 e 23 keV;
- ✓ Cristal monocromador de silício (111)
- ✓ Detector semicondutor de Si(Li), com resolução de 165 eV a 5,9 keV, e de HPGe, com resolução de 150 eV a 5,9 keV;
- ✓ Sistema semi-automático de posicionamento da amostra, com movimentos tridimensionais.

Na estação experimental de XRF, para a detecção dos raios X fluorescentes é utilizado um espectrômetro de alta resolução, baseado em um detector semicondutor de Si(Li), com janela de berílio de 8  $\mu$ m de espessura, uma área ativa de 30 mm<sup>2</sup>, acoplada a um módulo amplificador e placa analisadora multicanal.

Para a análise de amostras pela técnica de microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF) utiliza-se uma mesa para o alinhamento do capilar capaz de fornecer reprodutibilidade e alta resolução angular (69).

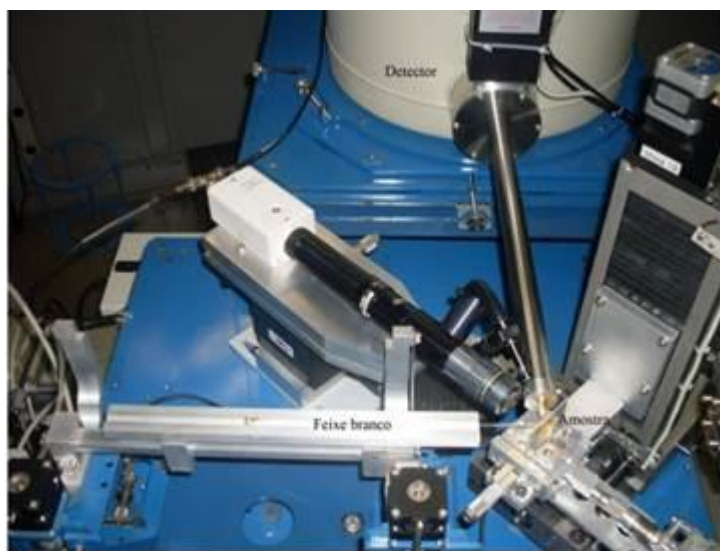
Quatro estágios de translação linear foram mecanicamente acoplados com lâminas flexíveis para fornecer translações e rotações perpendiculares ao eixo longitudinal do capilar.

O microfeixe é gerado com um fino capilar cônico com 20  $\mu$ m de diâmetro na saída. A estação de  $\mu$ XRF inclui além do detector dispersivo, um microscópio ótico com zoom motorizado e um conjunto de estágios X,Y,Z para o posicionamento da amostra. Todos estes estágios são completamente controlados remotamente. Para aquisição dos espectros para

$\mu$ XRF, utilizou-se um feixe branco de radiação para excitar as amostras, com dimensões de  $30 \times 30 \mu\text{m}$ , ou seja, varrendo a amostra a cada  $30\mu\text{m}$ , o que corresponde a um pixel no mapeamento, nas direções vertical e horizontal. As amostras foram presas em plástico filme, sendo este último preso a um suporte vazado de alumínio.

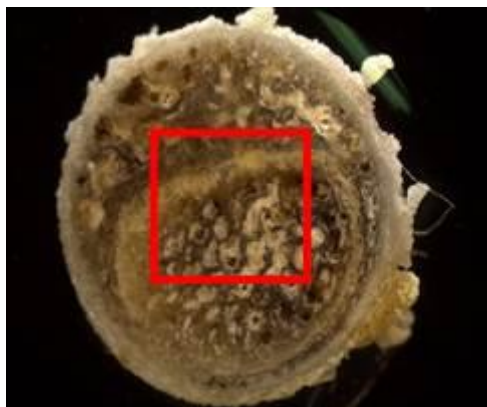
O suporte é posicionado a  $45^\circ$  em relação ao detector e ao feixe incidente e os raios X produzidos são detectados por um detector de Si(Li). Os espectros foram analisados no programa Axil(70), e os mapas bidimensionais foram obtidos após normalização das intensidades dos raios X característicos pelo valor da câmara de ionização, que mede a intensidade do feixe incidente na amostra (que é função da corrente do anel de armazenamento), conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2: Setup da linha de fluorescência de raio X.



Como os cortes dos fêmures eram de espessura bem reduzidas (aprox. 2 a 3 mm) e o tamanho do feixe de  $30 \times 30 \mu\text{m}$ , obtiveram-se matrizes de aproximadamente  $34 \times 34$  pixels (considerando que a amostra não foi varrida por inteira para análise) num total de cerca de 1.156 espectros, dependendo do tamanho da amostra, o que despendeu aproximadamente 3 horas para cada amostra, conforme ilustrado na figura 3.

Figura 3: Região selecionada em todos os fêmures, a fim de se padronizar o local a ser varrido pelo feixe.



Os elementos analisados foram: cálcio e zinco. Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos, determinação dos elementos e suas respectivas intensidades fluorescentes, foi utilizado o programa Quantitative X-Ray Analysis Software (QXAS) fornecido pela International Atomic Energy Agency (IAEA) (71).

### 3.10 MicroTomografia Computadorizada ( $\mu$ TC)

As microtomografias serão realizadas na linha SYRMEP (*SYnchrotron Radiation for MEDical Physics*) do laboratório de luz síncrotron ELETTRA, localizado na província de Trieste na Itália, dentro dos projetos “Dose Effects of Radiotherapeutic Procedures on Bone Structure Using Phase Contrast Micro-CT – Part I” (Projeto 2007834) e “Dose Effects of Radiotherapeutic Procedures on Bone Structure Using SR-microCT - Part II” (Projeto 20090192) sob coordenação da professora Regina Cély Barroso.

A linha de luz SYRMEP é uma das 24 linhas do ELETTRA. A divergência horizontal do feixe é de 7 mrad. Esta linha provê, a uma distância de 23 m da fonte, um feixe de raios X monocromático com área de seção máxima de  $140 \times 4 \text{ mm}^2$  a 20 keV. O monocromador é baseado em um sistema de duplo cristal de Si(111) funcionando na configuração de Bragg. O conjunto de cristais é equipado com controladores de movimentos de alta precisão para realizar alinhamentos angulares precisos do segundo cristal em relação ao primeiro. O feixe de saída é paralelo ao incidente com um deslocamento vertical de 20 mm. A faixa de energia

útil é de 8,5 – 35 keV ( $\Delta\lambda/\lambda \cong 10^{-3}$ ). O fluxo típico medido na posição da amostra a 17 keV é de aproximadamente  $1,6 \times 10^8$  fótons/mm<sup>2</sup>.s com uma corrente de elétron de 300 mA quando o ELETTRA está operando a 2,0 GeV, e  $5,9 \times 10^8$  fótons/mm<sup>2</sup>.s com 140 mA a 2,4 GeV (72). Todas as medidas foram realizadas com o ELETTRA operando a 2,0 GeV.

No esquema funcional da linha de luz SYRMEP a radiação é emitida pelos elétrons que circulam no anel quando sua trajetória é curvada pelo campo magnético do magneto curvante. A radiação assim emitida, pela tangente do anel, é policromática e a seleção da componente de energia desejada é definida pela difração sobre a superfície do cristal de silício sobre o plano cristalográfico. Para manter constante a direção de propagação dessa luz é escolhido um monocromador de dupla reflexão. A linha é completada por um sistema de fendas que definem as dimensões do feixe e por uma câmara de ionização que serve para medir a intensidade da radiação incidente sobre a amostra. O feixe é fixo e a aquisição das imagens é possível pelo movimento do objeto em frente ao feixe laminar.

Após tratamento das imagens, foi realizada a reconstrução 3D e quantificação histomorfométrica dos resultados utilizando software Image J<sup>®</sup> (BoneJ). Os índices histomorfométricos avaliados foram: a razão entre volume ósseo e volume total da amostra (BV/TV); a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp); a densidade de trabéculas (Tb.N).

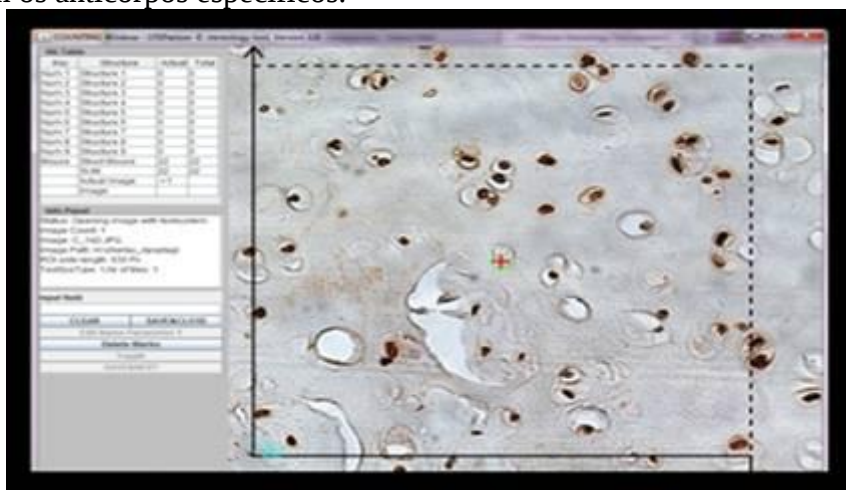
### 3.11 Análise dos dados

Os dados foram expressos como a média e seu erro padrão associado (EPM). A homogeneidade das variâncias foi confirmada através do teste de Bartlett. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste t bicaudal não-pareado. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

### 3.12 Quantificação das Células Imunomarcadas

Para a quantificação das células imunomarcadas através da técnica descrita no item 3.7.1 foi utilizado o programa STEPanizer ([www.stepanizer.com](http://www.stepanizer.com)) (73). Onde para cada grupo foram analisados 5 animais, para cada animal 3 lâminas, e para cada lâmina, foram obtidas imagens digitais de 3 campos, de forma a permitir a análise estatística correta. A figura 4 mostra o exemplo do uso deste programa para a de núcleos apoptóticos. Nesta imagem, observa-se a área teste com as linhas proibidas (linhas contínuas) e as linhas onde a contagem é considerada (linhas tracejadas).

Figura 4. Imagem obtida no programa STEPanizer, para a realização da contagem das células marcadas com os anticorpos específicos.

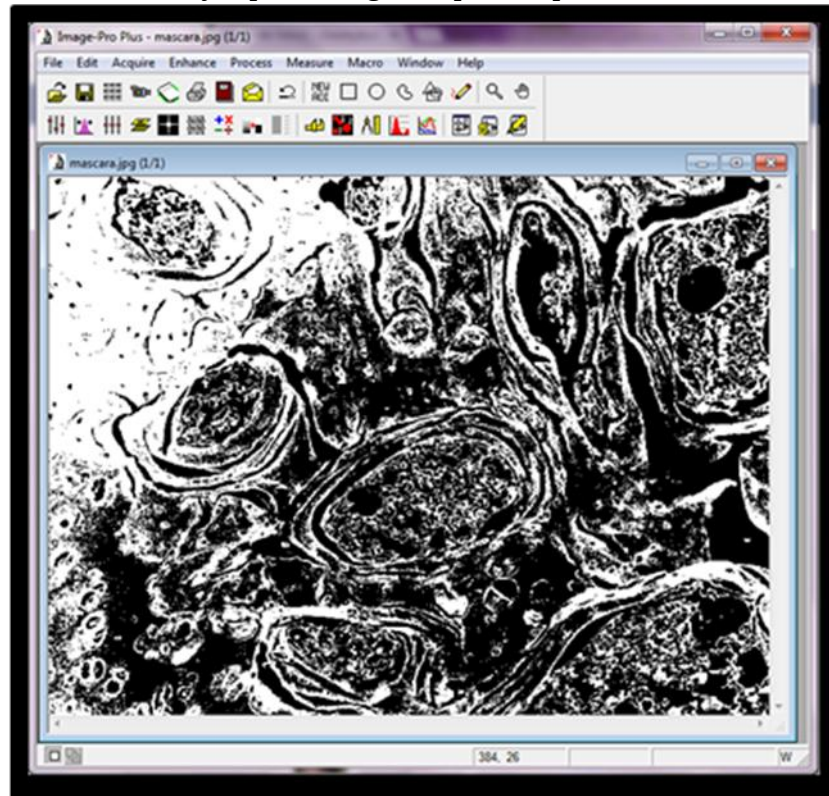


### 3.13 Quantificação de Colágeno

Para a quantificação da matriz orgânica óssea processadas através da técnica descrita no item 3.7.1 foi utilizado o programa Image Pro-Plus 5.0. Onde para cada grupo foram analisados 5 animais, para cada animal 3 lâminas, e para cada lâmina, foram obtidas imagens digitais de 3 campos, de forma a permitir a análise estatística correta. Após obtenção das imagens, em cada imagem foi selecionada a cor referente a imunomarcção (acastanhado) e utilizada a ferramenta mascara, que transforma a cor selecionada em branco e o resto em preto. Após isso foi feita a verificação da porcentagem de branco na imagem, que é

equivalente a porcentagem da imunomarcação. A figura 5 demonstra como fica a imagem após a utilização da ferramenta máscara.

Figura 5: Imagem no programa Image Pro-Plus 5.0 utilizando a ferramenta máscara para quantificação da imunomarcação para colágeno tipo I e tipo II.



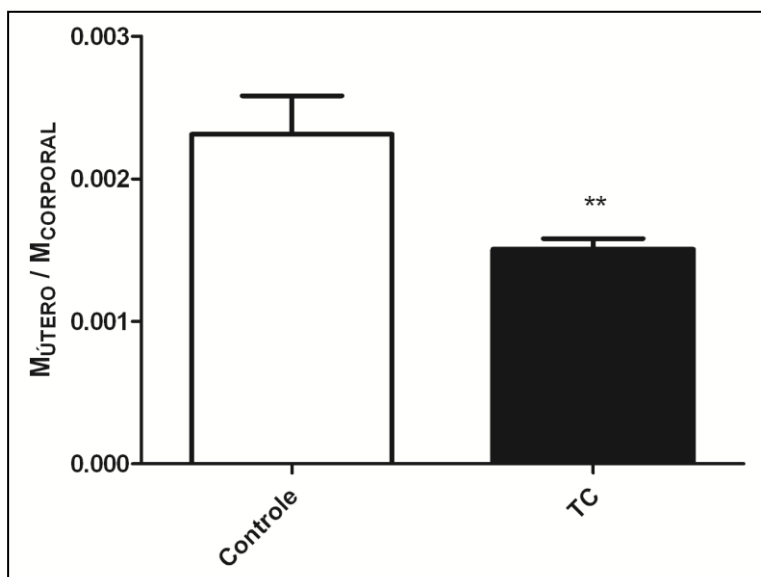
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Exames físicos

#### 4.1.1 Avaliação da massa uterina em resposta ao tratamento com poliquimioterapia

Foram obtidas as massas do útero de cada animal. As massas foram posteriormente normalizadas pela massa corporal de cada animal. Após tratamentos, a relação da massa útero/massa corporal dos animais controles foi de  $0,002312 \pm 0.0002706\text{gr}$  e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $0,001507 \pm 0.00007384\text{gr}$ . A figura 6 mostra o resultado desta correlação para o útero.

Figura 6: Massa do útero



Legenda: Massa do útero normalizada pela massa corporal nos grupos: controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $(**) = p \leq 0,01$ . M= massa.

Através da análise foi possível observar que houve uma redução de 34,8% da relação massa do útero/massa corpórea dos animais do grupo tratado em relação ao controle esse

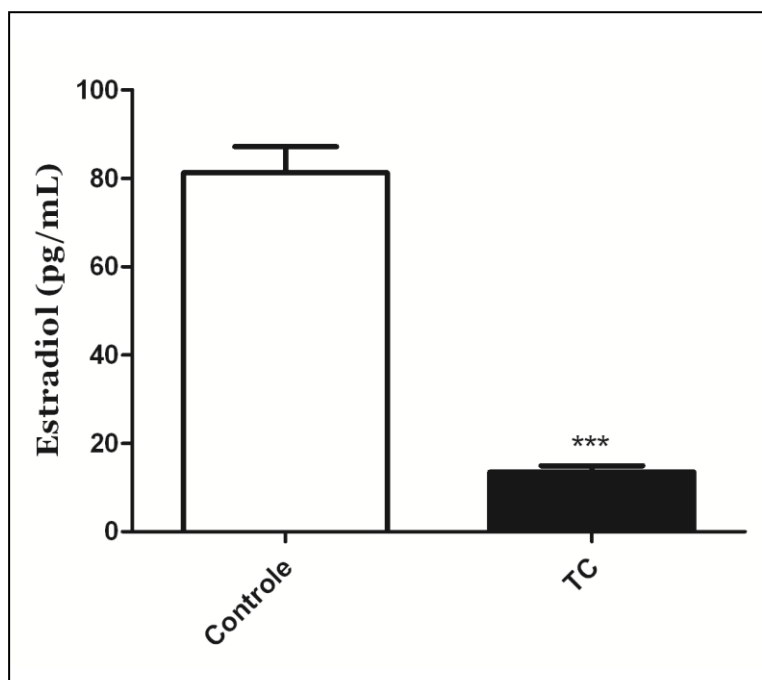
resultado sugere uma atrofia uterina provocada pela redução do nível de estrogênio circulante no sangue das ratas.

## 4.2 Determinação sorológica da variação de estradiol em reposta ao tratamento com poliquimioterapia

### 4.2.1 Radioimunoensaio Estradiol

Está técnica foi utilizada por ser um método ultra-sensível para a análise quantitativa das reações antígeno-anticorpo, que permitiu medidas rápidas e precisas. Após tratamentos, a relação da concentração de estradiol dos animais controles foi de  $81,25 \pm 5,935$  pg/ml e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $13,50 \pm 1,443$  pg/ml. A figura 7 mostra o resultado desta correlação para a dosagem sorológica.

Figura 7: Dosagem Sorológica de Estradiol



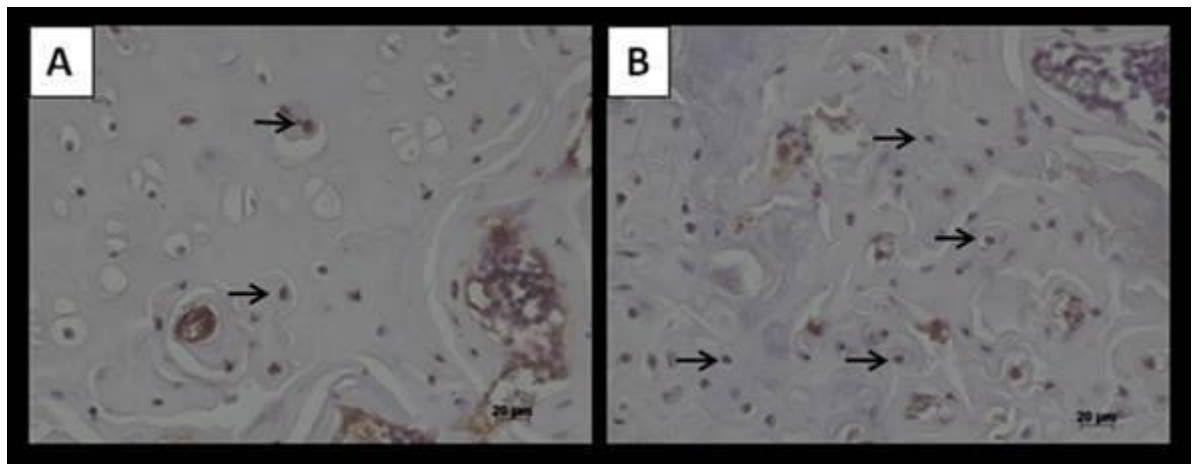
Legenda: Dosagem sorológica de estradiol dos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ .

Através da dosagem sorológica de estradiol, em conjunto com a atrofia uterina dos animais, pode-se observar redução de 83,3% de estrogênio circulante nos animais tratados em relação ao controle, indicando uma menopausa precoce.

#### 4.3 Avaliação histológica da marcação de catepsina-K, Osteopontina, Colageno-I, Colageno-II após tratamento com poliquimioterapia

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de marcar os osteoclastos ativos presentes no tecido ósseo. A catepsina K é um membro da família de proteases de cisteína papaína que é altamente expressa pelos osteoclastos ativados. A quantificação das células imunomarcadas foi realizada conforme o item 3.12. A figura 8 mostra as fotomicrografias referentes a cada grupo.

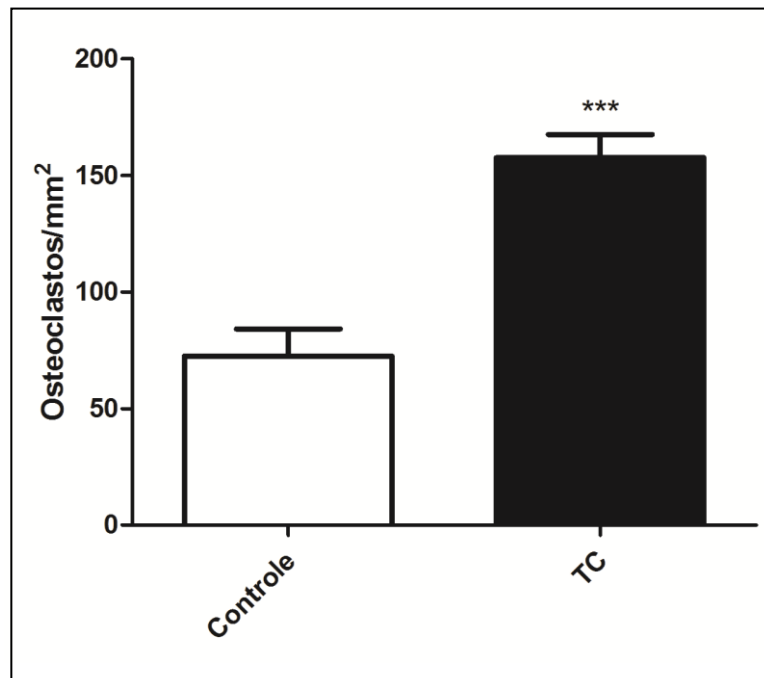
Figura 8: Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, da imunomarcação com o anticorpo catepsina K



Legenda: Os osteoclastos estão imunomarcados em marrom (seta). A) Grupo controle e B) Grupo tratado. Barra: 20µ.

Após tratamentos, a quantificação de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Catepsina K dos animais controles foi de  $72,57 \pm 11,60$  osteoclastos/mm<sup>2</sup> e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $157,60 \pm 9,98$  osteoclastos/mm<sup>2</sup>. A figura 9 mostra o resultado desta correlação em ambos os grupos, evidenciando um aumento de 117,2% de osteoclastos no grupo tratado em relação ao controle.

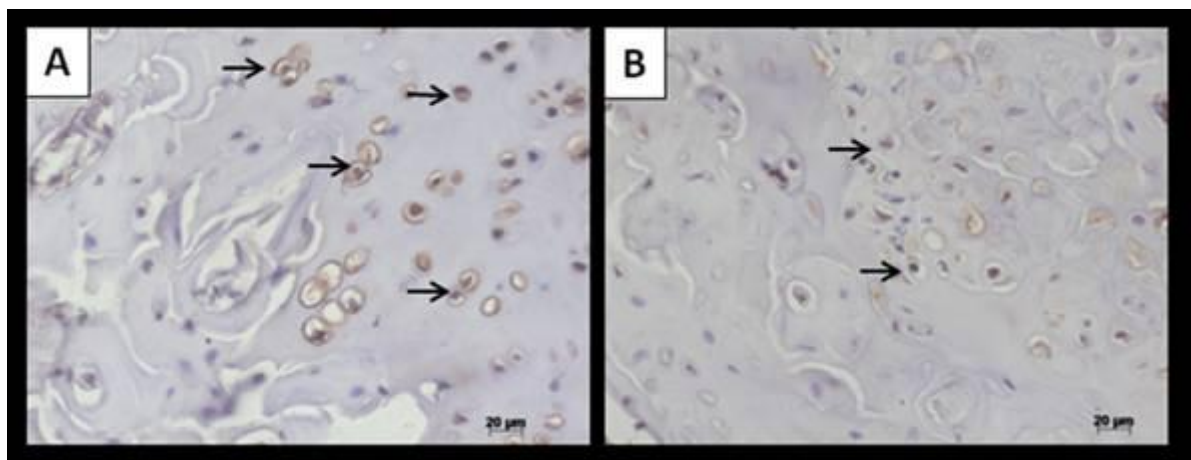
Figura 9. Quantidade de osteoclastos por  $\text{mm}^2$  dos grupos controle e tratado



Legenda: Quantidade de osteoclastos por  $\text{mm}^2$  dos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ .

A Osteopontina é uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz óssea, principalmente por osteoblastos. A quantificação das células imunomarcadas foi realizada conforme o item 3.12. A figura 10 mostra as fotomicrografias referentes a cada grupo.

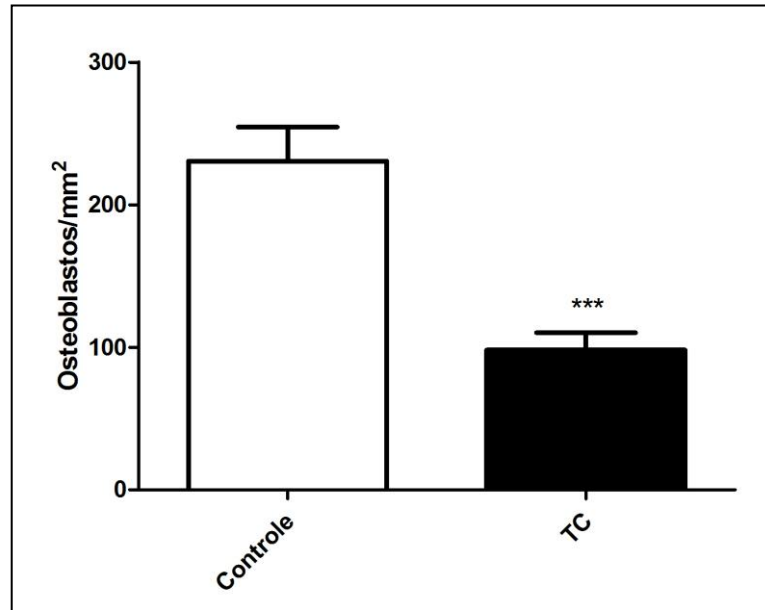
Figura 10: Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, da imunomarcção com o anticorpo osteopontina.



Legenda: Os osteoblastos estão imunomarcados em marrom (seta). A) Grupo controle e B) Grupo tratado. Barra:  $20\mu$ .

Após tratamentos, a quantificação de células imunomarcadas para o anticorpo anti-osteopontina dos animais controles foi de  $230,6 \pm 23,91$  osteoblastos/mm<sup>2</sup> e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $98,11 \pm 12,13$  osteoblastos/mm<sup>2</sup>. A figura 11 mostra o resultado desta correlação em ambos os grupos, evidenciando uma redução de 57,4% de osteoblastos no grupo tratado em relação ao controle.

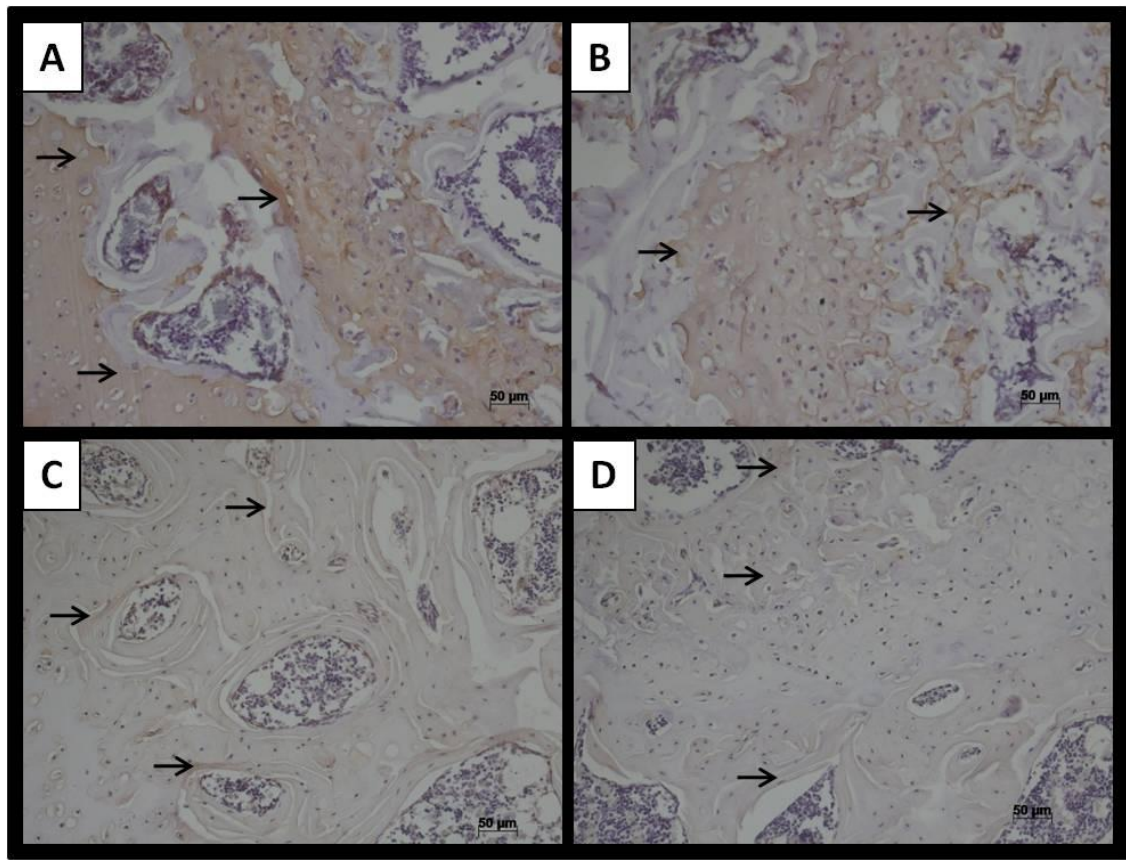
Figura 11. Quantidade de osteoblastos por mm<sup>2</sup> dos grupos controle e tratado.



Legenda: Quantidade de osteoblastos por mm<sup>2</sup> dos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ .

Para identificar e quantificar alterações em colágeno tipo I e II na matriz óssea, foi utilizado imunomarcção contra esses componentes da matriz. A quantificação da imunomarcção foi realizada conforme o item 3.13. Na figura 12 pode-se observar uma distribuição dos colágenos tipo I (12A,B) e tipo II (12C,D) na matriz óssea.

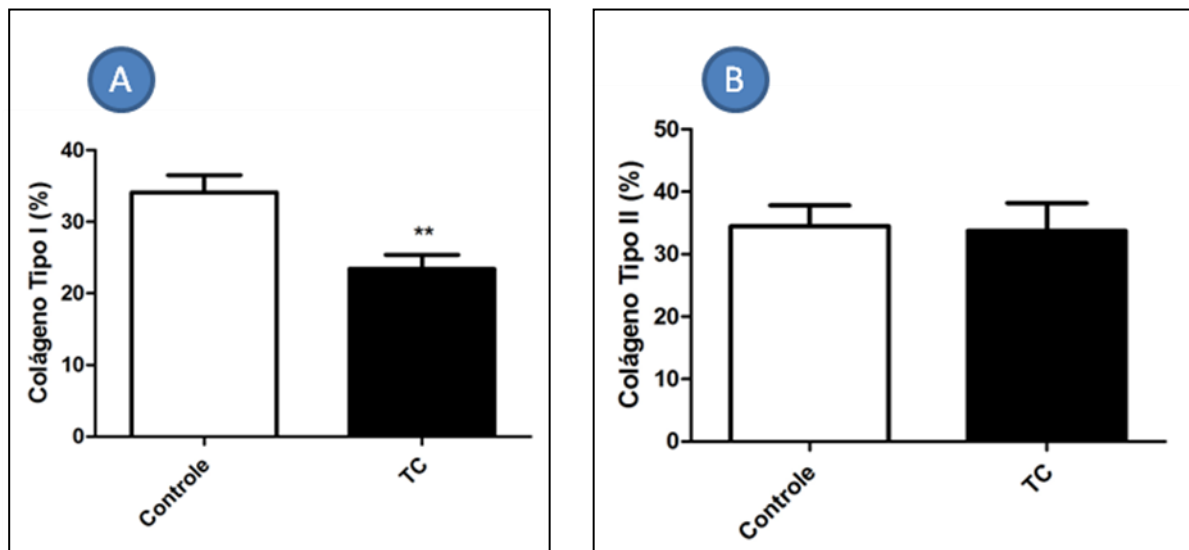
Figura 12: Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, imunomarcção para os anticorpos colágeno tipo I e tipo II.



Legenda: A) Colágeno tipo I no grupo controle e B) Colágeno tipo I no grupo tratado, C) Colágeno tipo II no grupo controle e D) Colágeno tipo II no grupo tratado. Barra: 50µ.

Após quantificação, a imunomarcção para o anticorpo anti-colágeno tipo I dos animais controles foi de  $34,12 \pm 2,41\%$  e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $23,42 \pm 1,95\%$ . E em relação ao anti-colágeno tipo II nos animais do controle foi de  $34,48 \pm 3,35\%$  e nos animais tratados foi de  $33,75 \pm 4,45\%$ . A figura 13 mostra os resultados destas correlações para ambos anticorpos, nos dois grupos estudados.

Figura 13. Distribuição do Colágeno tipo I e tipo II na matriz óssea dos grupos controle e tratado.

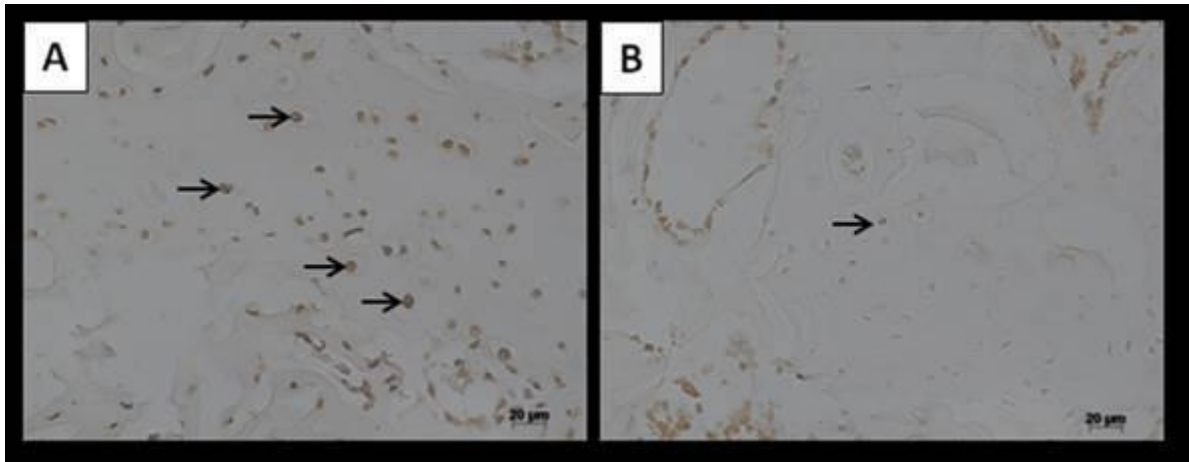


Legenda: Distribuição do Colágeno tipo I e tipo II na matriz óssea dos grupos controle e tratado. A) Colágeno tipo I e B) Colágeno tipo II. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*) =  $p \leq 0,01$ .

#### 4.4 Determinação de apoptose através da metodologia de TUNEL em resposta ao tratamento com poliquimioterapia

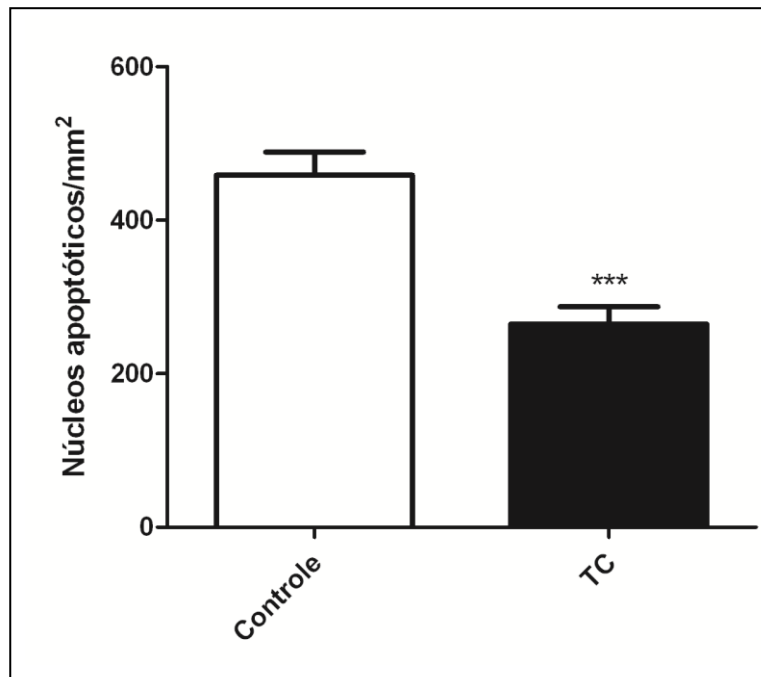
Para análise de apoptose em resposta aos tratamentos foi utilizada a metodologia de TUNEL. Na figura 14 visualiza-se fotomicrografias de células imunomarcadas através do método TUNEL em ambos os grupos. Após tratamentos, a relação de células imunomarcadas pelo método TUNEL dos animais controles foi de  $458,70 \pm 30,30$  núcleos apoptóticos/ $\text{mm}^2$  e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $264,70 \pm 22,63$  núcleos apoptóticos/ $\text{mm}^2$ , conforme figura 15. Os resultados encontrados demonstram uma redução de 45,5% nos núcleos em apoptose na epífise do fêmur do grupo tratado.

Figura 14: Fotomicrografia, epífise do fêmur dos animais, da imunomarcção pelo método TUNEL.



Legenda: As células em apoptose estão imunomarcadas em marrom (seta). A) Grupo controle e B) Grupo tratado. Barra: 20µ

Figura 15. Quantidade de núcleos apoptóticos por mm<sup>2</sup> dos grupos controle e tratado



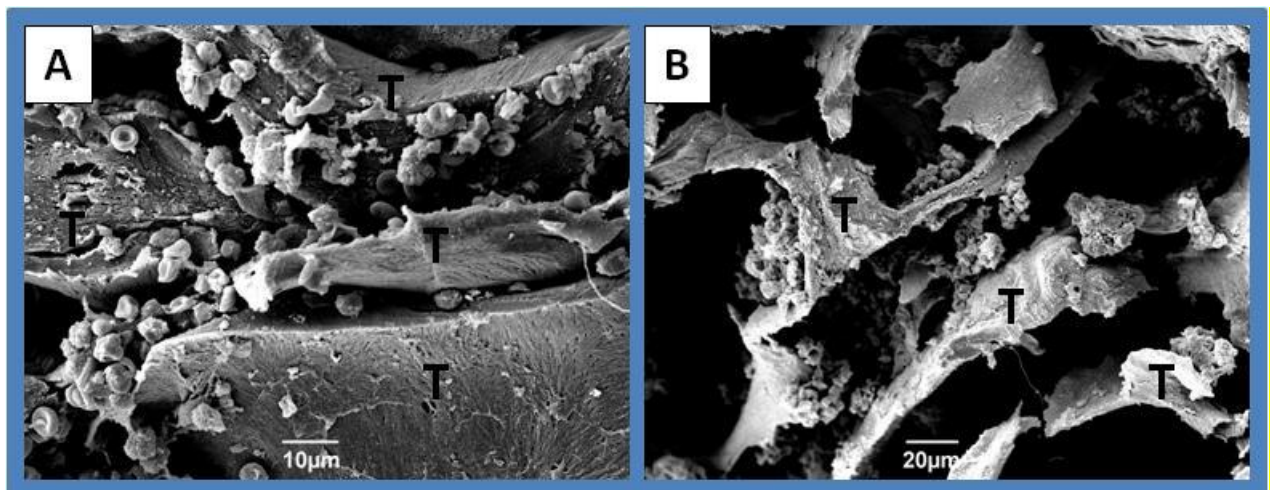
Legenda: Quantidade de núcleos apoptóticos por mm<sup>2</sup> dos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ .

## 4.5 Resultados da microscopia eletrônica

### 4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram obtidas imagens onde se podem observar alterações na densidade das trabéculas no grupo tratado, essas encontram-se mais finas que as do grupo controle, demonstrando uma fragilidade das mesmas. Em relação à distância entre as trabéculas, no grupo controle elas encontram-se próximas umas às outras, porém no grupo tratado essa distância é ainda maior, conforme ilustrado na figura 16.

Figura 16: Micrografias eletrônicas de varredura.



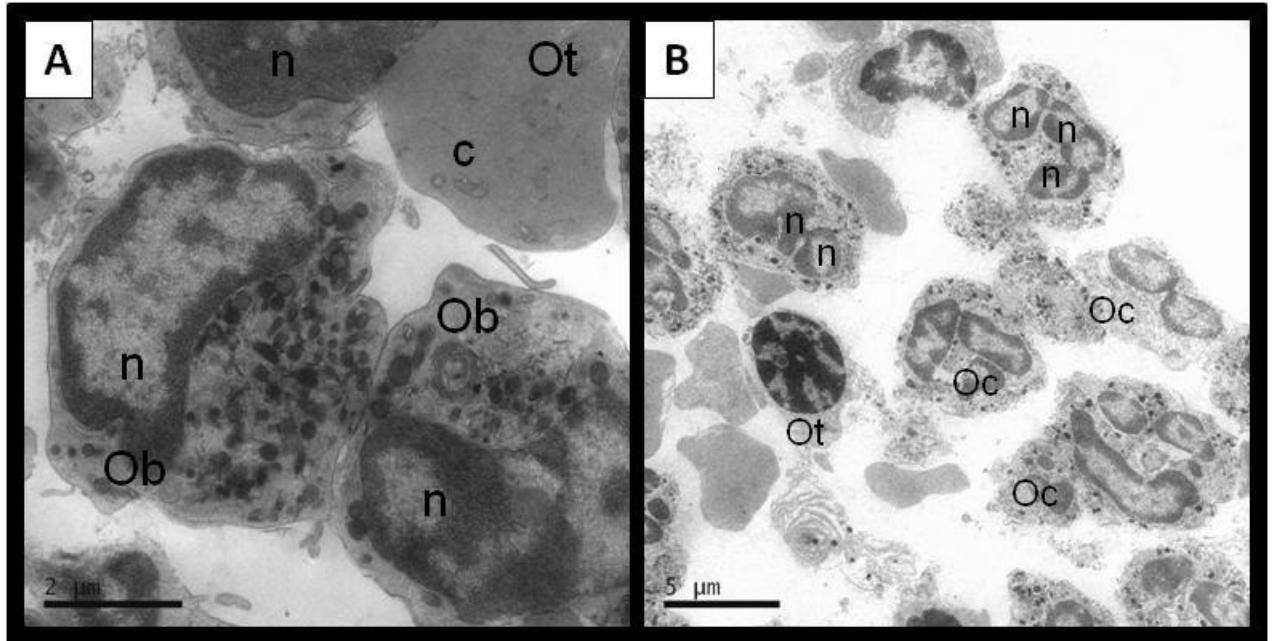
Legenda: A) No grupo controle as trabéculas (T) estão mais densas. B) No grupo tratado pode-se verificar que as trabéculas (T) encontram-se mais delgadas em relação ao grupo controle.

### 4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Através desta técnica foi observada a distribuição de osteoclastos e osteoblastos na epífise do fêmur, nos grupos controle e tratado. Nota-se que no grupo controle existem mais osteoblastos que osteoclastos nas regiões analisadas, o oposto do visualizado no grupo

tratado, onde a presença de osteoclastos é bem mais evidente comparada à de osteoblastos, conforme ilustrado na figura 17.

Figura 17: Micrografia eletrônica de transmissão.



Legenda: A) Grupo controle – região com osteoblastos (Ob) e osteócito (Ot). B) Grupo Tratado – região onde está presente muitos osteoclastos (Oc). n=núcleo.

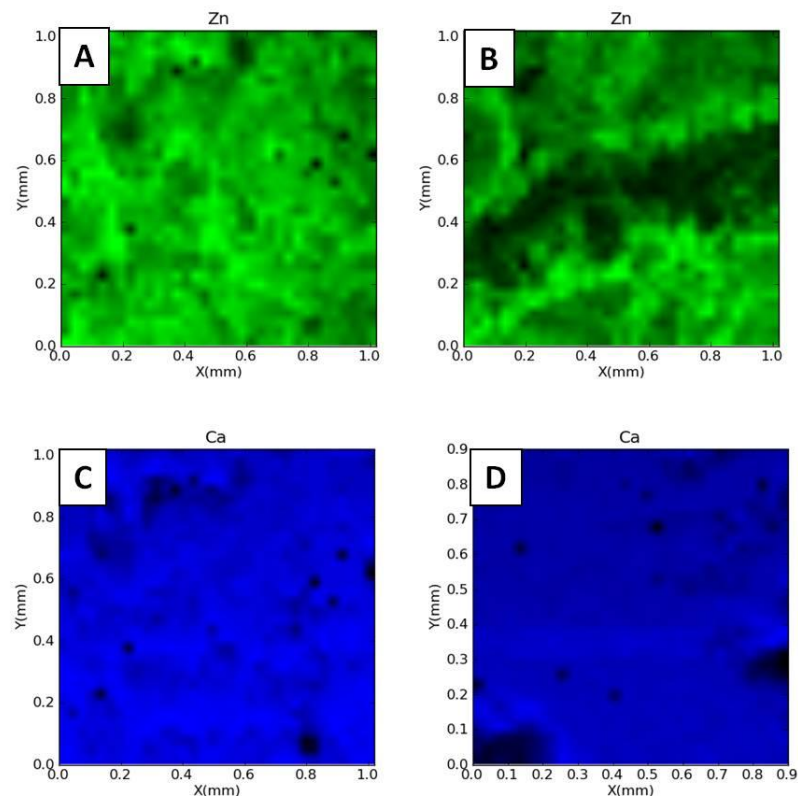
#### 4.6 Análise da matriz óssea através microfluorescência de raio-X após tratamento com poliquimioterapia

Nós últimos anos técnicas novas têm sido utilizadas para análise da matriz óssea. Dentre essas técnicas podemos citar a microfluorescência de raio-X (microXRF) e seu uso deve-se ao fato dela ser uma técnica de análise multielementar, altamente sensível, capaz de mapear a área desejada para estudo. A microXRF tornou-se a partir dos anos 90, uma técnica analítica bastante atrativa na análise local e mapeamento elementar de vários tipos de materiais.

#### 4.6.1 Concentração dos elementos Cálcio e Zinco

Foi realizada a quantificação de elementos essenciais pra matriz óssea como o cálcio e o zinco. Na figura 18 podemos observar a distribuição elementar do Cálcio (azul) e do Zinco (verde) na matriz óssea, obtidas por microXRF.

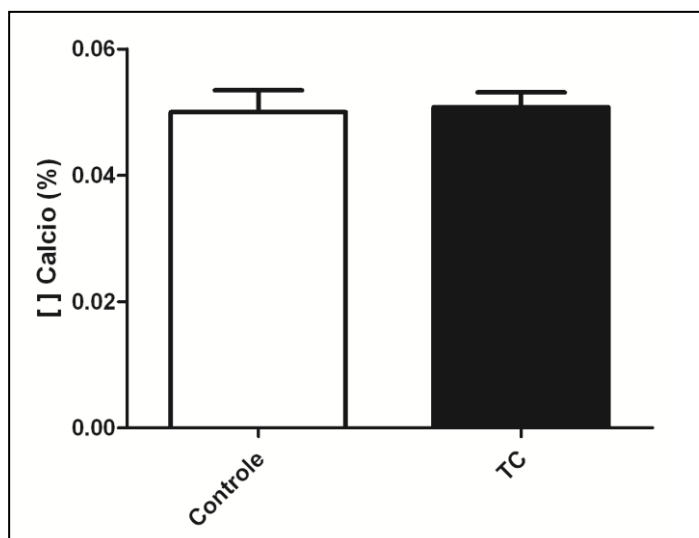
Figura 18: Distribuição elementar dos elementos Cálcio e Zinco nos grupos controle e tratado.



Legenda: A e B) Zinco no grupo controle e tratado, respectivamente e C e D) Cálcio no grupo controle tratado, respectivamente.

Após tratamentos, a relação da concentração de cálcio dos animais controles foi de  $0,0500 \pm 0,0035\%$  e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $0,0508 \pm 0,0023\%$ . A figura 19 mostra o resultado desta correlação da concentração do cálcio, entre os grupos evidenciando que a alteração provocada na matriz óssea desses animais não está relacionada com a redução do cálcio nos ossos.

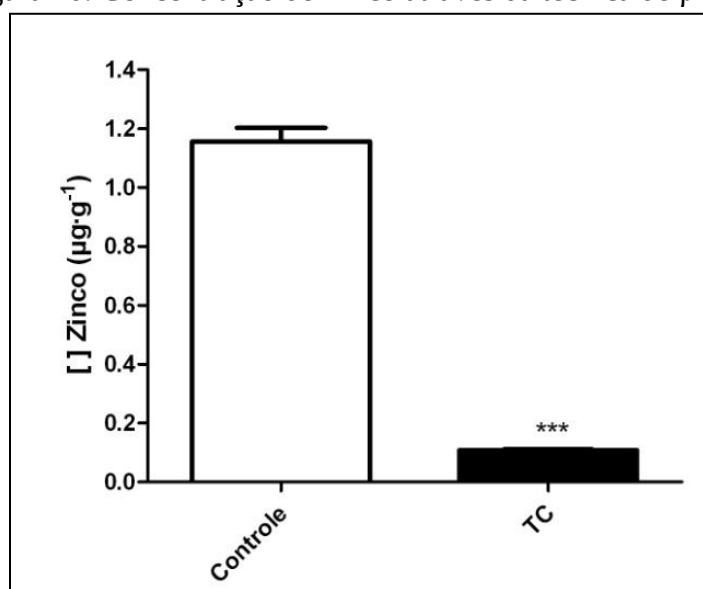
Figura 19. Concentração de Cálcio através da técnica de  $\mu$ -XRF



Legenda: Concentração de Cálcio através da técnica de  $\mu$ -XRF nos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM.

A relação da concentração de zinco dos animais controles foi de  $1,156 \pm 0,046 \mu\text{g/g}$  e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $0,108 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ . A figura 20 mostra o resultado desta correlação da concentração do zinco, onde se observa uma redução de 90,7% no grupo tratado em relação ao controle.

Figura 20. Concentração de Zinco através da técnica de  $\mu$ -XRF



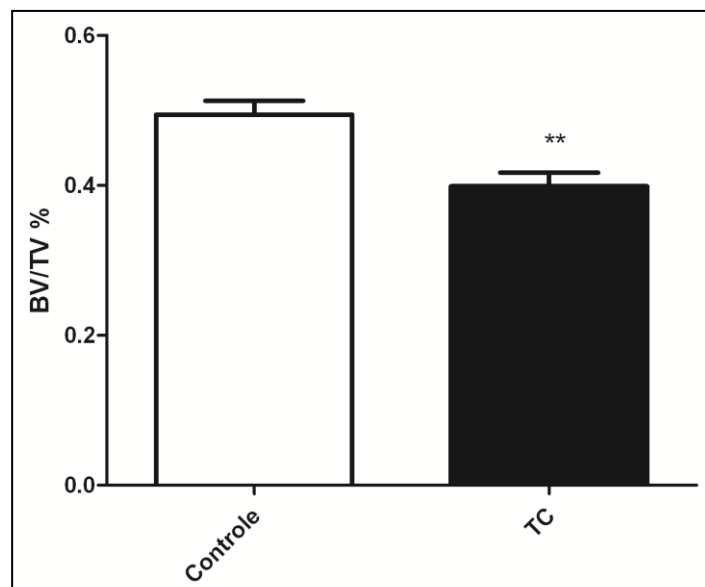
Legenda: Concentração de Zinco através da técnica de  $\mu$ -XRF nos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ .

#### 4.7 Avaliação morfológica através da $\mu$ -Tomografia Computadorizada após tratamento com poliquimioterapia

Muitos estudos para análise de parâmetros histomorfométricos dos ossos têm sido feitos com o auxílio da microtomografia computadorizada ( $\mu$ TC).

Após tratamentos, a relação do volume ósseo da epífise do fêmur em relação ao volume total da amostra dos animais controles foi de  $0,4944 \pm 0,0185\%$  e dos animais submetidos ao tratamento foi de  $0,3988 \pm 0,0180\%$ . A figura 21 mostra o resultado desta correlação do BV/TV, com uma redução de 19,3% do grupo tratado em relação ao controle.

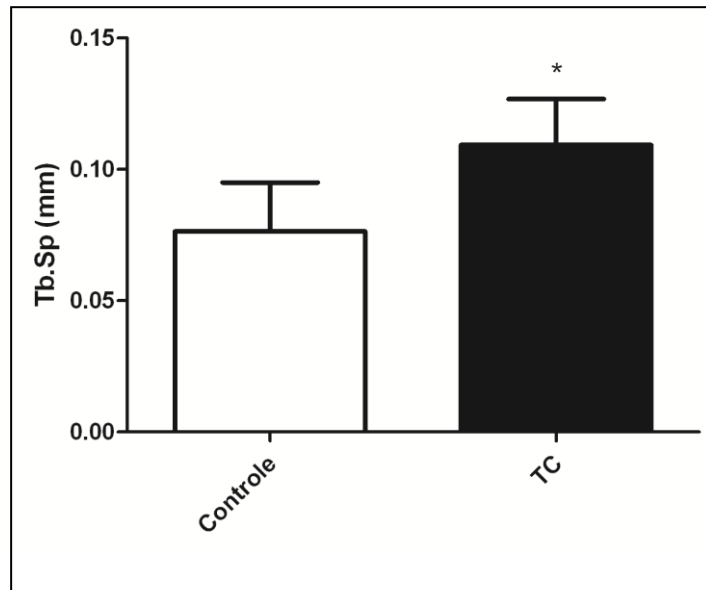
Figura 21. Razão entre volume ósseo e volume total da amostra por  $\mu$ -TC



Legenda: Razão entre volume ósseo e volume total da amostra por  $\mu$ -TC nos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $(**) = p \leq 0,01$ .

Na figura 22 observa-se um aumento de 43,2% no grupo tratado em relação ao controle, da separação média entre as trabéculas, parâmetro que analisa a distância entre uma trabécula e outra. Nos controles o valor obtido foi de  $0,0763 \pm 0,0083\text{mm}$  e nas amostras tratadas de  $0,1093 \pm 0,0087\text{mm}$ .

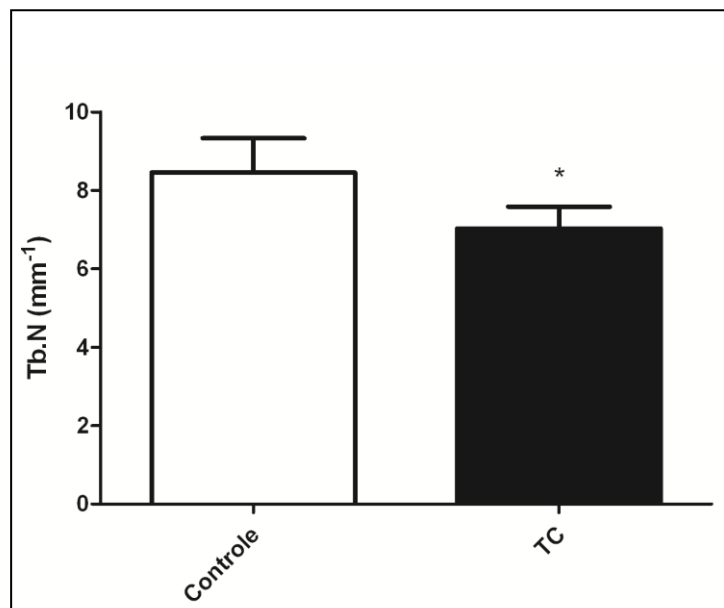
Figura 22. Separação média entre as trabéculas das amostras por  $\mu$ -TC



Legenda: Separação média entre as trabéculas das amostras por  $\mu$ -TC nos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*) =  $p \leq 0,05$ .

Na figura 23 observa-se uma redução de 16,9% no grupo tratado em relação ao controle na densidade das trabéculas. Nos controles o valor obtido foi de  $8,454 \pm 0,391 \text{ mm}^{-1}$  e nas amostras tratadas de  $7,027 \pm 0,277 \text{ mm}^{-1}$ .

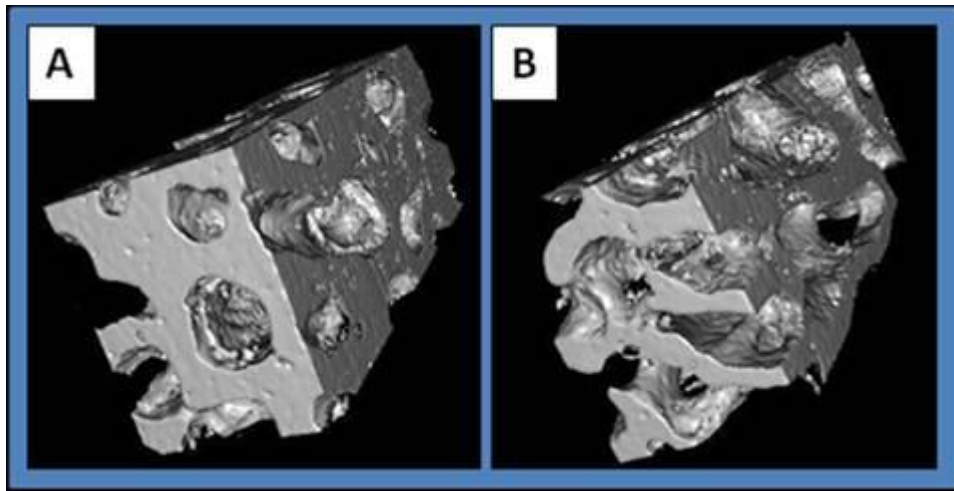
Figura 23. Densidade das trabéculas das amostras por  $\mu$ -TC



Legenda: Densidade das trabéculas das amostras por  $\mu$ -TC nos grupos controle e tratado. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*) =  $p \leq 0,05$ .

A reconstrução 3D da  $\mu$ -Tomografia computadorizada (figura 24) foi realizada a fim de demonstrar as diferenças encontradas nos parâmetros histomorfométricos analisados pela técnica. Pode-se observar uma diferença na micro estrutura da região trabecular da epífise do fêmur. No grupo controle as trabéculas estão mais compactas, os espaços entre elas é menor que no grupo tratado e a densidade óssea do grupo controle é maior que no grupo tratado. A imagem corrobora com os resultados das figuras 21, 22 e 23.

Figura 24. Reconstrução 3D da  $\mu$ -tomografia computadorizada.



Legenda: A) Grupo Controle e B) Grupo Tratado. Pode-se observar uma alteração na micro estrutura da região trabecular da epífise do fêmur.

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comuns no mundo todo (74). Hoje sabe-se que o tratamento para o CM pode levar ao surgimento de diferentes efeitos adversos tardios, entre eles a osteoporose (75). A osteoporose é caracterizada por uma alteração no remodelamento ósseo, causada por uma redução na massa óssea e deterioração estrutural dos ossos. Como consequência, esta patologia provoca fragilidade óssea e um aumento da vulnerabilidade a fraturas, diminuindo a qualidade de vida nas pacientes acometidas por esta doença (76).

Uma das principais causas de surgimento da osteoporose é a menopausa precoce, que (77)está associada à diminuição da concentração de estrogênio sérico (63). Um estudo desenvolvido por Vehmanen et al. (78), onde os autores acompanharam mulheres que passaram por tratamento com QT para CM por 10 anos, mostrou que aproximadamente 90% das mulheres apresentaram irregularidades no seu ciclo menstrual e tiveram alguma alteração significativa na BMD. Segundo Kalder et al (79) a utilização de inibidores da aromatase (IA) no tratamento de CM, induz uma perda óssea significativa, em 50% das mulheres tratadas com clodronato, embora este aumento no risco de fratura parece ser reversível após a descontinuação do tratamento com IA. A taxa de perda de BMD durante a terapia com inibidores de aromatase é muito superior à perda óssea observada em osteoporose pós-menopausa sem influência do tratamento para CM (80). Entretanto, a evolução desse processo patológico induzido por quimioterápicos não está elucidado, principalmente com a utilização de docetaxel e ciclofosfamida e neste contexto, nota-se a importância em caracterizar os mecanismos envolvidos na osteoporose precoce desenvolvida por pacientes tratados para o CM.

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo animal, usando ratas Wistar submetidas a 4 ciclos de quimioterapia com o objetivo principal de avaliar as alterações na matriz óssea em decorrência do uso dos poliquimioterápicos para o tratamento do CM. Dentre os diferentes tipos de quimioterápicos, mostramos a ação no osso, do docetaxel associado à ciclofosfamida, por se tratar de um esquema mais recente para terapia deste tipo de câncer.

A hipótese sugerida pelo nosso grupo, para explicar estas alterações, é que o tratamento com QT, abaixa os níveis de estrogênio e zinco. fato que afetaria o turnover da osteogênese, levando ao aumento da reabsorção óssea e diminuição da formação óssea, o que

poderia provocar a osteoporose precoce. Para podermos testar essa hipótese associamos técnicas sorológicas, histológicas, ultraestruturais e microtomográficas.

O primeiro resultado obtido nesse estudo foi da diminuição da massa uterina nas ratas do grupo TC. Além disso, os dados obtidos para dosagem sérica de estradiol mostram uma redução significativa deste parâmetro, no mesmo grupo. Sabe-se que o estrogênio regula alterações morfológicas nos órgãos reprodutores, como por exemplo no útero, a redução do nível de estrogênio leva à atrofia uterina (81). O estrogênio regula a mitose e alterações morfológicas nos órgãos reprodutores femininos, como o útero, durante o ciclo menstrual, a gestação e menopausa. O estroma uterino é rico em receptores de estrogênio, que quando ativados levam ao crescimento deste órgão, e quando antagonizados ou não ativados podem levar a atrofia do órgão (82). Logo, sugere-se que os poliquimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida promoveram alterações na produção de estrogênio pelos ovários, levando à atrofia do útero.

Após a análise dos resultados onde demonstrou-se uma alteração na produção de estrogênio, que está diretamente relacionada a modificações na matriz óssea e consequente osteoporose, foram realizadas algumas técnicas indicadoras de fatores importantes, que podem ser utilizadas para análise desta patologia. A imunohistoquímica para osteoclastos e osteoblastos, células essenciais para o turnover da osteogênese, foi realizada. Os resultados obtidos evidenciam um aumento do número de osteoclastos no tecido, e diminuição no número de osteoblasto no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle. Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea, enquanto que os osteoblastos são responsáveis pela formação do osso. Desta forma um desequilíbrio entre o número de osteoclastos e osteoblastos, conforme o obtido nesse estudo, pode significar o início do surgimento da osteoporose (83). A ação específica tanto do docetaxel quanto da ciclofosfamida, nos osteoblastos e osteoclastos, ainda é desconhecida. Com isso buscou-se elucidar como esses tipos celulares seriam afetados por esses quimioterápicos.

Além das imunohistoquímicas acima descritas, também foi realizado o ensaio TUNEL para apoptose. Quantitativamente, observou-se redução de aproximadamente 45% nos números de núcleos apoptóticos marcados no grupo tratado em relação ao controle. Embora não seja possível identificar com precisão o tipo de célula que está em apoptose, sugere-se que esta redução no número de núcleos apoptóticos seja devido à inibição da apoptose de osteoclastos. Sabe-se que o estrogênio tem ação pró-apoptótica sobre os osteoclastos, induzindo a via de apoptose extrínseca através dos receptores FasL (84). Em estudos anteriores, observou-se uma redução do número de osteoclastos em apoptose em resposta ao

tratamento com reposição de estrogênio, comparados ao controle (85, 86). Segundo Faloni et al (87) o estrogênio está diretamente relacionado à reabsorção óssea, embora este mecanismo ainda não esteja completamente elucidado.

O osso é constituído por uma matriz composta por elementos inorgânicos e orgânicos, dentre os elementos orgânicos o colágeno é o mais abundante(88). Para verificar alterações na distribuição de colágeno foi realizada imunohistoquímica para colágenos tipo I e II. Em relação ao colágeno tipo II, não houve diferença significativa na sua marcação entre os grupos analisados. Este tipo de colágeno é o predominante em tecido cartilaginoso, especialmente nas articulações (89). Já a quantificação do colágeno tipo I mostrou uma redução significativa da marcação nos animais tratados em relação ao controle. O papel do colágeno tipo I já é conhecido na formação óssea. Modificações na estrutura deste tipo de colágeno estão associadas à diminuição da BMD, e logo à osteoporose (90). A catepsina K, uma cisteína presente na lacuna de howship dos osteoclastos, atua degradando o colágeno tipo I presente na matriz óssea. Além disso, os osteoblastos promovem o aumento da deposição de colágeno na matriz (83). O aumento no número de osteoclastos, e diminuição de osteoblastos do grupo tratado em relação ao controle, como observado neste estudo através da imunohistoquímica para catepsina K e osteopontina, respectivamente, mostram a degradação, e a não deposição, do colágeno tipo I no osso dos animais tratados.

Os dados obtidos através da técnica de  $\mu$ -XRF mostram que talvez o cálcio não tenha papel tão importante na osteoporose provocada pela administração do poliquimioterápico TC, pois a distribuição elementar do Ca não alterou-se após o tratamento com essa QT. Enquanto isso, a distribuição do Zn na matriz óssea estava reduzida no grupo TC. Os íons de Zn estimulam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (91). O zinco é essencial para o crescimento, manutenção e integridade do tecido ósseo. Diversas patologias relacionadas ao desenvolvimento do osso estão associadas à deficiência de Zn, entre elas a osteoporose (92). Um estudo realizado por Gurban e Mederle (93), com mulheres na menopausa, mostrou uma redução média de 65% na concentração de zinco no osso. O acúmulo de zinco na matriz óssea estimula a síntese de colágeno pelos osteoblastos, desempenhando portanto importante papel na mineralização e formação do osso (92).

A técnica de  $\mu$ -TC pode ser usada para obter imagens em 3D de biópsias de osso. Dentre os parâmetros analisados nesta técnica estão o BV/TV, que mostra o percentual de osso na amostra; o Tb.Sp, que mostra o espaçamento entre as trabéculas; e o Tb.N, que refere-se à densidade de trabéculas no tecido ósseo (94). Neste trabalho mostramos que o BV/TV e o Tb.N estavam diminuídos nas ratas do grupo tratado com QT, enquanto que o Tb.Sp estava

aumentado, estes resultados sugerem que haja diminuição da quantidade de tecido ósseo propriamente dito nas amostras analisadas deste grupo, e que suas trabéculas estão espaçadas e mais delgadas. Outros autores mostram alterações nestes mesmos parâmetros em mulheres na menopausa, auxiliando no diagnóstico de osteoporose; e também em ratas ovariectomizadas (77, 95).

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura e transmissão corroboram com os resultados obtidos anteriormente. Através das imagens obtidas por MEV observou-se que as trabéculas do grupo tratado com TC encontravam-se mais espaçadas e delgadas, quando comparadas com o grupo controle. Enquanto, nas imagens obtidas por MET, de forma qualitativa, notou-se aumento no número de osteoclastos em relação aos osteoblastos nos animais submetidos à poliquimioterapia.

Analizando os resultados obtidos em conjunto, sugere-se que a etapa inicial para o desenvolvimento da osteoporose, causada pelo poliquimioterápico TC, seja a diminuição da função ovariana. Este evento leva à diminuição da concentração de estrogênio sérico, o que causa a atrofia uterina. Concomitante a estes fatos, o TC causa redução na concentração de zinco no tecido ósseo. Estes resultados associados causam um desequilíbrio na relação osteoblastos/osteoclastos no osso. A redução do estrogênio leva a diminuição da apoptose de osteoclastos, enquanto que a redução do zinco inibe a função dos osteoblastos. Este desequilíbrio interfere no turnover do osso, de forma a aumentar a reabsorção óssea. Deste modo, o percentual de osso fica reduzido, as trabéculas tornam-se mais finas e espaçadas. O endpoint deste processo é a osteoporose.

Alguns estudos sugerem a reposição de cálcio e vitamina D para o tratamento da osteoporose induzida pelo tratamento do CM (96-99). No entanto, mostramos nesse trabalho que os poliquimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida não alterou a concentração de cálcio, porém gerou o processo de osteoporose. Como vimos o zinco pode ser o metal responsável por modular este processo. Portanto sugerem-se estudos futuros para entender os mecanismos envolvidos na osteoporose provocada por TC, assim como o papel do zinco nesta patologia.

## CONCLUSÃO

- o tratamento com os poliquimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida gerou uma redução dos níveis de estrogênio;
- os poliquimioterápicos usados causaram alterações ósseas relevantes;
- o estrogênio e o Zinco possuem papel fundamental na osteoporose induzida pelo docetaxel e ciclofosfamida.

## REFERÊNCIAS

1. Nogueira L. Microtomografia Computadorizada e MicroFluorescência de Raios-X por Luz Síncrotron para Avaliação dos Efeitos da Radiação em Microestruturas ósseas de Ratos. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011.
2. Ana Paula Roque da Silva CPN, Jéssica Luna de Oliveira Silva, Juliana Moreira de Oliveira Ferreira, Julio Fernando Pinto Oliveira, Marceli de Oliveira Santos, Marise Souto Rebelo, Rejane de Souza Reis, Suelen Rosales Vitorino da Silva. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. CEDC, editor: INCA; 2011.
3. Cutuli B. Strategies in treating male breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(2):193-202.
4. Kamila C, Jenny B, Per H, Jonas B. How to treat male breast cancer. *Breast*. 2007;16(2):S147-54.
5. Leinung S, Horn LC, Backe J. Das Mammakarzinom des Mannes - Historie, Epidemiologie, Ätiologie, Genetik und Histopathologie. *Zentralblatt für Chirurgie*. 2007;132(5):379-85.
6. Muñoz-Torres M, Reyes-García R, Mezquita-Raya P, Fernández-García D, Alonso G, Dios Luna Jd, et al. Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate. *Maturitas*. 2009;64(3):188-92.
7. INCa. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2011.
8. Murad A. Tratamento Sistêmico do câncer de mama. *Revista Sociedade Brasileira de Cancerologia*. 2000;9.
9. Boguey JC, Buzdar AU, Hunt KK. Recent Advances in the Hormonal Treatment of Breast Cancer. *Current Problems in Surgery*. 2008;45(1):13-55.
10. INCa. Ações de enfermagem para o controle do câncer uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro 2002.
11. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, et al. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Ann Oncol*. 2003 Jun;14(6):833-42.
12. S Ward ES, S Davis, D Hind, A Rees, A Wilkinson. Taxanes for the adjuvant treatment of early breast cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*. 2007;11(40):139.
13. Souza MVNd. NOVOS PRODUTOS NATURAIS CAPAZES DE ATUAR NA ESTABILIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS, UM IMPORTANTE ALVO NO COMBATE AO CÂNCER. *Quim Nova*. 2004;27(2):5.
14. Vikas Malhotra VJD, Alan P. Lyss, Clay M. Anderson, Steven Westgate, Michelle Reynolds, Barbara Barrett, Michael C. Perry. Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy with Doxorubicin and Docetaxel in Locally Advanced Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2004;5(5):8.
15. John Crown MOL, Wei-Seong Ooi. Docetaxel and Paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *The Oncologist*. 2004;9(suppl 2):9.
16. ULKA VAISHAMPAYAN REP, BHASKARA R. JASTI, MAHA HUSSAIN. TAXANES: AN OVERVIEW OF THE PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS. *UROLOGY*. 1999;54(suppl 6A):8.
17. Kondo N TA, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids*. 2010;543-31.
18. Chibber S HI, Farhan M, Salman M, Naseem I. White light augments chemotherapeutic potential of cyclophosphamide: an in vitro study. *Biometals*. 2013;26(1):23-31.
19. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids*. 2010;2010:543531.

20. Chibber S, Hassan I, Farhan M, Salman M, Naseem I. White light augments chemotherapeutic potential of cyclophosphamide: an in vitro study. *Biometals*. 2013 Feb;26(1):23-31.
21. Munzone E, Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Goldhirsch A. CMF revisited in the 21st century. *Ann Oncol*. 2012 Feb;23(2):305-11.
22. Hernández-Ochoa I KB, and. Flaws JA. The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Female Reproductive System. *Biochem Pharmacol* 2009;27(4):547-59.
23. Clarke BL, Khosla S. Female reproductive system and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;503(1):118-28.
24. Guyton A, Hall J, editors. *Tratado de Fisiologia Médica*: Elsevier; 2006.
25. Buffet N, Bouchard P. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *ChronobiolInt*. 2001;18:893-919.
26. Berne R, Levy M, editors. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
27. Wojtys E, Huston L, N. T, Lindenfeld T, Hewett T, Greenfield M. Association between the menstrual cycle and anterior cruciate ligament injuries in female athletes. *The American Journal of Sports Medicine*. 1998;26(5):614-9.
28. Vander A, Sherman J, Luciano D, editors. *Human Physiology - The Mechanisms of Body Function*. New York: McGraw-Hill; 2001.
29. Chaves C, Simão R, Araújo C. Ausência de variação da flexibilidade durante o ciclo menstrual em universitárias. *Rev Bras Med Esporte*. 2002;8(6):212-8.
30. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4A):609-14.
31. Kierszenbaum A, editor. *Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia*. 1 ed: Elsevier; 2004.
32. Sales E. *Estudo da Qualidade Óssea através da Técnicas de Microtomografia e Microfluorescência de Raios-X*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010.
33. Ramalho ACR, Lazaretti-Castro M, Cohen-Solal ME, de Vernejoul MC. Por Que Estrógeno e Raloxifeno Melhoram a Densidade Mineral Óssea? Mecanismo de Ação do Estrógeno e de Um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Oss. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000;44(6):471-82.
34. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:3597-602.
35. Baron R, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. New York: Lippincott-Ravin; 1996.
36. Eriksen E, Axelrod D, Meilsen F, editors. *Bone histomorphometry*. New York: Raven; 1994.
37. Bouxseins L. Bone Quality Where do We go From Here? *Osteoporosis International*. 2003;14(5):118-27.
38. Lépori R, editor. *Atlas de Osteoporose*. São Paulo: Soriak Comercio e Promoções SA; 2004.
39. Stange RK, D; Timmen, M et al. . Age related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin  $\alpha 2\beta 1$  deficient mice. *Bone*. 2013;56(48-54.).
40. Herrmann M, Seibel M. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review. *Clinica Chimica Acta*. 2008;393(2):57-75.
41. Leafer D, Sweeney M, Kellerman L, Avnur Z, Krstenansky J, Vickery B, et al. Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related pep -tide-(1-34), and bovine PTH-(1-34). *Endocrinology*. 1995;136(8):3624-31.
42. Pacifici R. Estrogen, Cytokines and Pathogenesis of Postmenopausal Osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11(8):1043-51.
43. Silvestrini G, Mocetti P, Ballanti P, Di Grezia R, Bonucci E. In vivo incidence of apoptosis evaluated with the TdT FragEL TM DNA fragmentation detection kit in cartilage and bone cells of the rat tibia. *Tissue Cell*. 1998;30:627-33.

44. Faloni APS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2007;36(2):181-88.
45. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest*. 2000 Nov;106(10):1203-4.
46. Herrmann M SM. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review. *Clinica Chimica Acta*. 2008;393(2):57-75.
47. Faloni APS CP. Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea. . *Revista de Odontologia da UNESP*. 2007;36(2):181-88.
48. Pacifici R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012;27(2):231-9.
49. Bjarnason NH, Hitz M, Jorgensen NR, Vestergaard P. Adverse bone effects during pharmacological breast cancer therapy. *Acta Oncologica*. 2008;47(4):747-54.
50. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 2000;21(2):115-37.
51. Parikka V, Lehenkari P, Sassi M, Halleen J, Risteli J, Harkonen P, et al. Estrogen Reduces the Depth of Resorption Pits by Disturbing the Organic Bone Matrix Degradation Activity of Mature Osteoclasts. *Endocrinology* 2001;142(12):5371-8.
52. White C. Oral Radiographic Predictors of Osteoporosis. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2002;31(2):84-92.
53. Thurner PJ, Wyss P, Voide R, Stauber M, Stamparoni M, Sennhauser U, et al. Time-lapsed investigation of three-dimensional failure and damage accumulation in trabecular bone using synchrotron light. *Bone*. 2006;39(2):289-99.
54. Lima I, Farias MLF, Percegoni N, Rosenthal D, de Assis JT, Anjos MJ, et al. Micro imaging analysis for osteoporosis assessment. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2010;65(3):253-7.
55. Saarto T, Blomqvist C, Vdlimski M, Makela P, Sarna S, Elomaa I. Chemical Castration Induced by Adjuvant Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil Chemotherapy Causes Rapid Bone Loss That Is Reduced by Clodronate: A Randomized Study in Premenopausal Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15(4):1341-7.
56. Seeman E, Delmas P. Bone Quality - The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *N Engl J Med*. 2006;354:2250-61.
57. Hillner BE. American Society of Clinical Oncology 2003 Update on the Role of Bisphosphonates and Bone Health Issues in Women With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(21):4042-57.
58. Ralston SH. What Determines Peak Bone Mass and Bone Loss? *Baillière's Clinical Rheumatology*. 1997;11:479-94.
59. Edwards BJ RD, Shankaran V et al. Cancer Therapy Associated Bone Loss: Implications for Hip Fractures in Mid-Life Women with Breast Cancer. . *Clin Cancer Res*. 2011;17(3):560-8.
60. Peyman HZ, M; Maskow, C et al. . The influence of chemotherapy on bone mineral density, quantitative ultrasonometry and bone turnover in pre-menopausal women with breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45:3205-12.
61. Bines J OD, Cobleigh MA. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14(5):1718-29.
62. Hines SM, BA; Sloan. JA. Phase III Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Trial of Risedronate for the Prevention of Bone Loss in Premenopausal Women Undergoing Chemotherapy for Primary Breast Cancer *Journal of clinical oncology*. 2009;27(7):1047-53.
63. Pfeilschifter J DI. Osteoporosis Due to Cancer Treatment: Pathogenesis and Management. *J Clin Oncol*. 2000;18(7):1570-93.
64. Vehmanen LS, T; Elomaa, I. Long-term impact of chemotherapy-induced ovarian failure on bone mineral density (BMD) in premenopausal breast cancer patients. The effect of adjuvant clodronate treatment. . *Eur J Cancer*. 2001;37:2373-8.

65. Loo WJ, LJ; Cheung, MNB; Chow, LWC; Min Wang, M. Combination of radiological and biochemical methods to assess bone mineral density of mandible in fully edentulous patients after chemotherapy: a 5-year prospective study. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(1 suppl):S109-S15.
66. Schwartz AF, FNP; Winters-Stone, K Gallucci, B. Exercise Effects on Bone Mineral Density in Women With Breast Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Oncology nursing forum*. 2007;34(3):627-33.
67. Gordon AH, BA; Shapiro, CL. Premature ovarian failure and body composition changes with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Menopause*. 2011;18(11):1244-8.
68. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar;22(3):659-61.
69. Melo Júnior AS. Análise quantitativa do material particulado na região de Campinas através das técnicas de microfluorescência de raios X e reflexão total usando radiação síncrotron. Campinas: UNICAMP; 2007.
70. Bernasconi G, Haselberger N, Markowicz A, Valkovic V. Applications of a capillary based X ray microfluorescence system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 1994;86:333-8.
71. Bernasconi G, Haselberger N, Markowicz A, Valkovic V. Applications of a capillary based X ray microfluorescence system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 1994;86:333-8.
72. ABRAMI A, ARFELLI F, BARROSO RC, BERGAMASCHI A, BILLÈ F, BREGANT P, et al. Medical Applications of Synchrotron Radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A*. 2005;548:221-7.
73. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc*. 2011 Jul;243(1):47-59.
74. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2013;63(1):11-30.
75. Beatrice J. Edwards DWR, Veena Shankaran et al. Cancer Therapy Associated Bone Loss: Implications for Hip Fractures in Mid-Life Women with Breast Cancer. *Cancer Res*. 2011;1:560-8.
76. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
77. Zupan J, van't Hof RJ, Vindisar F, Haring G, Trebse R, Komadina R, et al. Osteoarthritic versus osteoporotic bone and intra-skeletal variations in normal bone: evaluation with microCT and bone histomorphometry. *J Orthop Res*. 2013 Jul;31(7):1059-66.
78. Vehmanen LK, Elomaa I, Blomqvist CP, Saarto T. The effect of ovarian dysfunction on bone mineral density in breast cancer patients 10 years after adjuvant chemotherapy. *Acta Oncol*. 2013 May 29.
79. Kalder M, Ziller V, Kyvernitakis I, Knoll D, Hars O, Hadji P. Influence of compliance on bone mineral density changes in postmenopausal women with early breast cancer on Anastrozole. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Jun;139(6):915-23.
80. Body JJ. Increased fracture rate in women with breast cancer: a review of the hidden risk. *BMC Cancer*. 2011;11:384.
81. Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Sato T, Iguchi T, Ohta Y. Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure. *In Vivo*. 2012 Nov-Dec;26(6):899-906.
82. Suzuki A, Urushitani H, Watanabe H, Sato T, Iguchi T, Kobayashi T, et al. Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland. *J Vet Med Sci*. 2007 Jul;69(7):725-31.
83. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *The Lancet*. 2011;377(9773):1276-87.
84. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Minireview: Osteoprotective Action of Estrogens Is Mediated by Osteoclastic Estrogen Receptor- *Molecular Endocrinology*. 2009;24(5):877-85.

85. Crusode de Souza M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. *J Anat.* 2009 Dec;215(6):673-81.
86. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res.* 2007 Jun;42(3):193-201.
87. Faloni APdS, Sasso-Cerri E, Rocha FRG, Katchburian E, Cerri PS. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *Journal of Anatomy.* 2012;220(1):77-85.
88. Wallace JM, Erickson B, Les CM, Orr BG, Banaszak Holl MM. Distribution of type I collagen morphologies in bone: relation to estrogen depletion. *Bone.* 2010 May;46(5):1349-54.
89. Macdonald DW, Squires RS, Avery SA, Adams J, Baker M, Cunningham CR, et al. Structural variations in articular cartilage matrix are associated with early-onset osteoarthritis in the spondyloepiphyseal dysplasia congenita (sedc) mouse. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16515-31.
90. Garnero P, Cloos P, Sornay-Rendu E, Qvist P, Delmas PD. Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: the OFELY prospective study. *J Bone Miner Res.* 2002 May;17(5):826-33.
91. Odabasi E, Turan M, Aydin A, Akay C, Kutlu M. Magnesium, zinc, copper, manganese, and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis. Can magnesium play a key role in osteoporosis? *Ann Acad Med Singapore.* 2008 Jul;37(7):564-7.
92. Yamaguchi M. Nutritional factors and bone homeostasis: synergistic effect with zinc and genistein in osteogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2012 Jul;366(1-2):201-21.
93. Gurban CV, Mederle O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(3 Suppl):1113-9.
94. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989 Feb;4(1):3-11.
95. Kim T, Ha H, Shim KS, Cho WK, Ma JY. The anti-osteoporotic effect of Yijung-tang in an ovariectomized rat model mediated by inhibition of osteoclast differentiation. *J Ethnopharmacol.* 2013 Mar 7;146(1):83-9.
96. Datta M, Schwartz GG. Calcium and vitamin D supplementation and loss of bone mineral density in women undergoing breast cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 Aug 7.
97. Hadji P, Gnani M, Body JJ, Bundred NJ, Brufsky A, Coleman RE, et al. Cancer treatment-induced bone loss in premenopausal women: A need for therapeutic intervention? *Cancer Treatment Reviews.* 2012;38(6):798-806.
98. Murthy V, Chamberlain RS. Menopausal symptoms in young survivors of breast cancer: a growing problem without an ideal solution. *Cancer Control.* 2012 Oct;19(4):317-29.
99. Kim SH, Cho YU, Kim SJ, Lee JE, Kim JH. Low bone density in breast cancer survivors in Korea: prevalence, risk factors and associations with health-related quality of life. *Eur J Oncol Nurs.* 2013 Apr;17(2):196-203.

## ANEXO – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/010/2012 sobre “**Avaliação dos efeitos do tratamento para o câncer de mama em ratos Wistar**”, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Veloso de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **29/02/2012**. Este certificado expira em **29/02/2016**.

Rio de Janeiro, 29 de Fevereiro de 2012.

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva*  
*Proj. Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ*  
*Matricula 34765-8*

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br