

LETÍCIA CRISTINA DIAS LIMA

Estrôncio nanocarreado na remissão de quadro semelhante à osteoporose em Zebrafish (*Danio rerio*)

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Janeiro/2021

LETÍCIA CRISTINA DIAS LIMA

Estrôncio nanocarreado na remissão de quadro semelhante à osteoporose em Zebrafish (*Danio rerio*)

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. José Dias Corrêa Junior

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro/2021

043 Lima, Letícia Cristina Dias.
 Estrôncio nanocarreado na remissão de quadro semelhante à osteoporose em Zebrafish (*Danio rerio*) [manuscrito] / Letícia Cristina Dias Lima. – 2021.
 95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Dias Corrêa Junior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Osteoporose. 3. Nanoestruturas. 4. Estrôncio. 5. Peixe-Zebra. I. Corrêa Junior, José Dias. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

LETÍCIA CRISTINA DIAS LIMA

338/2021
entrada
2º/2018
2018717035

Às quatorze horas do dia 29 de janeiro de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: " ESTRÔNCIO NANOCARREADO NA REMISSÃO DE QUADRO SEMELHANTE À OSTEOPOROSE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. José Dias Corrêa Júnior, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADA
Dr. Gregory Thomas Kitten	UFMG	APROVADA
Dr. Antônio Carlos Santana Castro	UFJF	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.

O resultado foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de janeiro de 2021.

Dr. José Dias Corrêa Júnior (Orientador)

Ph.D. Gregory Thomas Kitten

Dr. Antônio Carlos Santana Castro

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior, e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pois sem ele nada seria possível!

Aos meus pais Maria Aparecida e Caetano, e aos meus irmãos Fernando e Guilherme, pois seus incentivos me fizeram chegar até aqui.

A minha madrinha (*in memória*), que sempre me incentivou e se alegrava em demonstrar o quão importante é cuidar do próximo.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior, pela oportunidade e ensinamentos.

Aos Professores Drs. Gregory Thomas Kitten, Antônio Carlos Santana Castro, Marcos Augusto de Sá e o Dr. Ives-Charlie da Silva, por aceitarem prontamente participar da Banca de Defesa dessa dissertação, e disporem do seu tempo para contribuir com tal trabalho.

Aos companheiros do Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA) e a todos que passaram por ele.

Aos Professores Drs. Valbert Nascimento Cardoso e Simone Odília Antunes Fernandes, e seus alunos do Laboratório de Radioisótopos, da Escola de Farmácia da UFMG.

A Prof.^a. Dr.^a. Clésia Cristina Nascentes, do departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG.

A Prof.^a. Dr.^a. Daniella Chemim de Melo Hoyos e seus alunos do Laboratório de Peixes Ornamentais, do LAQUA, da Escola de Veterinária da UFMG.

A Prof.^a. Dr.^a. Marivalda de Magalhães Pereira e seus alunos do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, da Escola de Engenharia da UFMG.

A minha amiga Ms. Adriana Heloísa pelos conselhos e ensinamentos, durante toda a minha caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela oportunidade.

Aos professores do departamento de morfologia e fisiologia do ICB-UFMG, que de alguma formam influenciaram nas perspectivas e nas formas de avaliação deste trabalho.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, que de certa forma contribuíram para o meu trabalho, o meu sincero,

Muito Obrigado!

*“Pode afirmar-se com certa segurança
que existe uma ignorância abecedária, que precede a ciência
e outra ignorância doutoral que segue a ciência”*

(Michel Eyquem de Montaigne)

*“A ciência compõe-se de erros, que por sua
vez são passos para a verdade.”*

(Júlio Verne)

RESUMO

A osteoporose é uma doença osteometabólica, que afeta principalmente mulheres pós-menopausa e idosos, sendo relacionada ao desequilíbrio entre a taxa de reabsorção e síntese óssea. As terapias disponíveis para o tratamento clínico, utilizam fármacos de baixa absorção, que requerem administração diária ou um tratamento semanal, mensal ou semestral, com compostos de alto custo. Sabendo que o desenvolvimento de formulações e terapias mais acessíveis, auxiliam na obtenção de uma melhor qualidade de vida para o paciente, apresentamos nesta dissertação os resultados da síntese e avaliação *in vivo*, de nanomaterial fosfatado contendo estrôncio (NPM-Sr), no tratamento de quadro semelhante a osteoporose induzida por prednisona, tendo como modelo animal o Zebrafish (*Danio rerio*), em um período de 7 dias, além de fazemos uma comparação deste tratamento, frente ao ranelato de estrôncio. Nesta abordagem utilizamos 4 grupos experimentais (controle – CT, osteoporótico – PN, osteoporótico tratado com nanomaterial fosfatado contendo estrôncio – NM-Sr e osteoporótico tratado com ranelato de estrôncio – R-Sr), composto por 10 animais cada. Os dados foram adquiridos através de técnicas histológicas (histoquímica e citoquímica) e analíticas (EDXMA, TXRF, radiomarcagem com $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$ e ICP-MS), a fim de avaliar a homeostase do cálcio, mecanismos de remodelação óssea e dinâmica de elementos químicos. Os resultados demonstram, que o estrôncio nanocarreado é capaz de melhorar o aspecto das escamas comparado ao grupo PN (diferença média -0,3551, $p < 0,05$), e das concentrações séricas de elementos químicos como o cálcio e o cobre, frente este mesmo grupo (diferença média -0,1697 e -0,0618, $p < 0,05$, respectivamente), além de demonstrar menor alteração nas concentrações de estrôncio em relação ao grupo R-Sr (diferença média -0,6414, $p < 0,05$). Estes dados fornecem uma perspectiva para o uso deste nanomaterial, no tratamento de quadro semelhante a osteoporose induzida por prednisona em Zebrafish, ainda que em concentrações 228 vezes inferior ao preconizado no tratamento com o ranelato de estrôncio.

Palavras-chave: Osteoporose induzida por glicocorticoide; Zebrafish; Nanomaterial fosfatado; Ranelato de Estrôncio.

ABSTRACT

Osteoporosis is an osteometabolic disease that affects the mainly postmenopausal women and the elderly, being related to imbalance between the rate of resorption and bone synthesis. The therapies available for clinical treatment use low-absorption drugs that require daily administration or a weekly, monthly, or semiannual treatment with high-cost compounds. Know that the development of more accessible formulations and therapies, helps to obtain a better quality of life for the patient, we present in this dissertation the results of the synthesis and *in vivo* evaluation of phosphate nanomaterial containing strontium (NPM-Sr), in the treatment of a condition similar to prednisone-induced osteoporosis, having as an animal model zebrafish (*Danio rerio*) in a period of 7 days, in addition to making a comparison of this treatment, against the strontium ranelate. In this approach we used 4 experimental groups (control - CT, osteoporotic - PN, osteoporotic treated with phosphate nanomaterial containing strontium - NM-Sr and osteoporotic treated with strontium ranelate - R-Sr), composed of 10 animals each. The data were acquired through histological (histochemical and cytochemical) and analytical (EDXMA, TXRF, radiomarking with $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$ and ICP-MS) techniques, to value calcium homeostasis, bone remodeling mechanisms and chemical element dynamics. The results show that the nanocarrier strontium can improve the appearance of scales compared to the PN group (mean difference -0.3551, $p < 0,05$) and serum concentrations of chemical elements such as calcium and copper front this same group (mean difference -0.1697 and -0.0618, $p < 0,05$, respectively), besides demonstrating less change in strontium concentrations in relation to the R-Sr group (mean difference -0.6414, $p < 0,05$). These data provide a perspective for the use of this nanomaterial in the treatment of prednisone-induced osteoporosis in Zebrafish, although at concentrations 228 times lower than recommended in the treatment with strontium ranelate.

Keywords: glucocorticoid-induced osteoporosis; Zebrafish; Phosphate nanomaterial; Strontium ranelate.

LISTA DE FIGURAS

FIG.2.1.1 - Formação óssea intramembranosa. Adaptado de GARTNER & HIATT, 2007.	5
FIG.2.1.2 - Formação óssea endocondral. Adaptado de AGHAJANIAN & MOHAN, 2018.	6
FIG.2.2.1 - Os principais elementos celulares, hormonais e estruturais envolvidos na remodelação óssea. Adaptado de PARFFIT, 1980; TANAKA, NAKAYAMADA & OKADA, 2005; MURTHY, MORROW & THERIAULT, 2009; MATSUMOTO <i>et al.</i> , 2016; IQBAL <i>et al.</i> , 2018.	9
FIG.2.3.1 - (a) Valores de referência para a DMO. Adaptado de TeleDensitometria, 2018; (b) Classificação de risco de fratura de acordo com a técnica do FRAX. Adaptado de EASTELL <i>et al.</i> , 2019.	12
FIG.2.4.1 -Abordagens terapêuticas. Adaptado de BRENNAN <i>et al.</i> , 2009; HANLEY <i>et al.</i> , 2012; CONNELLY, 2016.	15
FIG.2.7.1 - Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).	22
FIG.2.7.2 - Mecanismo de ação da prednisona. Setas em azul representam redução e setas em vermelho aumento. Adaptado de KLEIN, 2015; SARINHO & MELO, 2017.	24
FIG.4.2.1 - Metodologia de desenvolvimento de protocolo. (a) desenho experimental; (b) processo de injeção e (c) coleta de sangue.	33
FIG.5.1.1 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura, demonstrando a morfologia dos NPM-Sr.	38
FIG.5.1.2 - Espectro de microanálise de raio X (EDXMA) obtido após colimação de feixe eletrônico sobre NPM-Sr, demonstrando presença de oxigênio, cálcio, estrôncio e fósforo. O carbono observado tem origem na metalização e base de Termanox necessários à análise.	40
FIG.5.4.1 - Imagem microscópica demonstrando o aspecto e coloração das escamas de Zebrafish, de acordo com o grupo experimental e técnica histológica e citoquímica, em 7 dias de tratamento.	46
FIG.A1.1 - CEUA	79

LISTA DE GRÁFICOS

GRA.5.3.1 -Percentual de sobrevivência dos exemplares ao longo do tempo experimental ($T_{8\text{dias}}$). Nível de significância estatística $p < 0,05$ (*) conforme determinado por método de comparação de curva de sobrevivência - Log-rank (Mantel-Cox) test.	44
GRA.5.4.1 - Número de escamas de Zebrafish avaliadas pelas técnicas de alizarina red S e TRAP.	45

LISTA DE TABELAS

TAB.2.5.1 - Informações atômicas dos elementos químicos cálcio e estrôncio.	19
TAB.5.2.1 - Parâmetros físico-químicos da água dos aquários de acordo com o grupo e o tempo de análise, para o ensaio de escamas e de elementos químicos encontrados em amostras de sangue, em um período de 8 dias.....	41
TAB.5.2.2 - Parâmetros físico-químicos da água dos aquários de acordo com o grupo e o tempo de análise, em um período de 8 dias.....	41
TAB.5.2.3 - Parâmetros físico-químicos da água dos aquários de acordo com o grupo e o tempo de análise, em um período de 8 dias.....	42
TAB.5.2.4 - Concentração de amônia e nitrito, em um período de 8 dias	43
TAB.5.4.1 - Determinação do número mínimo de escamas de Zebrafish.	45
TAB.5.4.2 - Remodelação óssea das escamas de Zebrafish, em 7 dias de tratamento.	46
TAB.5.5.1 - Taxa de marcação do complexo radiomarcador (CPM), na porção esquelética de Zebrafish, em 7 dias de tratamento.	47
TAB.5.6.1 - Concentração de elementos químicos, presentes em amostras de sangue de Zebrafish, em 7 dias de tratamento.	49
TAB.5.6.2 - Correlação elementar dentro do grupo CT, em 7 dias de tratamento....	54
TAB.5.6.3 - Correlação elementar dentro do grupo PN, em 7 dias de tratamento. ...	54
TAB.5.6.4 - Correlação elementar dentro do grupo NM-Sr, em 7 dias de tratamento.	54
TAB.5.6.5 - Correlação elementar dentro do grupo R-Sr, em 7 dias de tratamento.	55
TAB.5.7.1 - Concentração de estrôncio em amostras de água, em um período de 24 horas.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μA – Microampère	EDXMA – Microanálise de energia dispersiva de raio X (<i>energy-dispersive X ray microanalysis</i>)
μCi – Micro quiri	eV – elétron volt
μg – Microgramas	Fe – Ferro
μL – Microlitros	FIG. – Figura
μM - Micromolar	FRAX – Ferramenta de avaliação de risco de fratura (<i>fracture risk assessment tool</i>)
μm – Micrometro	GC – Glicocorticoide
μS – Microsiemens	GRA. – Gráfico
ζ – Zeta	GP - Grupo
AL – Alendronato de Sódio	ICP-MS - Espectrômetro de massa por plasma indutivamente acoplado (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
BATs – Terapias ósseas anabólicas (<i>bone anabolic therapies</i>)	IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina (<i>insulin-like growth factor</i>)
BMPs – Proteínas morfogenéticas ósseas (<i>bone morphogenetic protein</i>)	IL – Interleucina (<i>interleukin</i>)
C – Carbono	K – Potássio
Ca – Cálcio	kcps – Quilo contagem por segundo
Ca^{2+} – Íon Cálcio	keV – Quilo elétron-volt
CaSR – Receptor sensível a cálcio (<i>calcium-sensing receptor</i>)	kGy – Quilo gray
CE – Grupo controle experimental	kV – Quilo volt
Cl – Cloro	KH – Dureza de carbonatos (<i>carbonate hardness</i>)
CO_2 – Dióxido de carbono (<i>carbono dioxide</i>)	M - Molar
CT – Grupo controle	mBar - Milibar
Cu - Cobre	
DMO – Densidade mineral óssea	
DP – Desvio padrão	
E2 – Estrógeno	

mg – Miligramas	RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (<i>receptor activator of nuclear fator kappa B ligand</i>)
MKs – Megacariócitos (<i>megakaryocytes</i>)	RE – Ranelato de estrôncio
mL – Mililitros	rpm – Rotações por minuto
mM - milimolar	R-Sr – Grupo ranelato de estrôncio
Mn – Manganês	Se - Selênio
Mo – Molibdênio	SERMs – Moduladores seletivos de receptores de estrogênio (<i>selective estrogen receptor modulator</i>)
nd – não detectável	Sr – Estrôncio
NE – Nanopartícula de estrôncio	Sr ²⁺ - Íon estrôncio
NFκB – Fator nuclear kappa B (<i>nuclear factor kappa B</i>)	T - Tempo
NH ₃ – Amônia (<i>Ammonia</i>)	TAB. – Tabela
NM – Nanomaterial	TGF – Fator de crescimento transformante (<i>transforming growth factor</i>)
NM-Sr – Grupo tratado com nanomaterial fosfatado contendo estrôncio	TGFβ – Fator de crescimento transformante beta (<i>transforming growth fator beta</i>)
NO ₂ – Nitrito (<i>Nitrite</i>)	TNF – Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
NPs – Nanopartículas	TXRF - Espectrômetro de fluorescência de raio X por reflexão total (<i>total reflection X ray fluorescence spectroscopy</i>)
NPM – Nanomaterial de fosfato	UBMs – Unidades básicas multicelulares
NPM-Sr – Nanomaterial de fosfato contendo estrôncio	W - walts
O ₂ – Oxigênio (<i>Oxygen</i>)	Zn - Zinco
P - Fósforo	
ppm – Partes por milhão	
PR - Prednisona	
PTH – Hormônio da paratireoide ou paratormônio (<i>parathyroid hormone</i>)	
RANK – Receptor ativador do fator nuclear kappa B (<i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>)	

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	3
1.1 ROTEIRO DA DISSERTAÇÃO	4
CAPÍTULO 2. REFERENCIAL TEORICO	5
2.1 FORMAÇÃO ÓSSEA	5
2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	7
2.3 OSTEOPOROSE	10
2.3.1 <i>Quadro Clínico</i>	12
2.4 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	13
2.4.1 <i>Terapias Ósseas Anabólicas</i>	14
2.4.1.1 Teriparatida	15
2.4.1.2 Romosumab	16
2.4.2 <i>Terapias Ósseas Antirreabsortivas</i>	16
2.4.2.1 Denosumab	16
2.4.2.2 Alendronato de sódio.....	17
2.4.3 <i>Ranelato de Estrôncio</i>	17
2.5 ESTRÔNCIO.....	18
2.6 NANOCARREAMENTO EM FORMULAÇÕES BIOMÉDICAS	20
2.7 MODELO EXPERIMENTAL.....	22
2.8 TÉCNICAS HISTOMORFOMÉTRICAS DE AVALIAÇÃO	24
2.9 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE AVALIAÇÃO	25
2.9.1 <i>Avaliação utilizando complexo radiomarcador ^{99m}Tc/MDP</i>	25
2.9.2 <i>Avaliação das concentrações séricas de elementos químicos</i> ...	26
2.9.3 <i>Avaliação das concentrações de estrôncio na água</i>	26
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	28

3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
CAPÍTULO 4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DOS NANOMATERIAIS FOSFATADOS CONTENDO ESTRÔNCIO	30
4.1.1 <i>Caracterização Físico-química</i>	30
4.2 PROCESSOS DE INDUÇÃO COM PREDNISONA E DESENHOS EXPERIMENTAIS	31
4.2.1 <i>Avaliações físico-químicas da água em ensaios de manutenção</i>	31
4.2.2 <i>Processamento metodológico dos materiais biológicos analisados</i>	31
4.2.2.1 Avaliação de quadro osteoporótico, atividade osteogênica e elementar em Zebrafish	33
4.2.2.1.1 Avaliação osteogênica das escamas de Zebrafish	34
4.2.2.1.1 Avaliação osteogênica corporal de Zebrafish	35
4.2.2.1.3 Avaliação das concentrações séricas de elementos químicos	36
4.2.3 <i>Processamento metodológico para a determinação de remobilização e excreção de estrôncio em amostras de água em 24 horas</i>	37
4.2.4 <i>Análise estatística</i>	37
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DE NANOMATERIAIS FOSFATADOS CONTENDO ESTRÔNCIO	38
5.2 AVALIAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA EM ENSAIOS DE MANUTENÇÃO	40
5.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	43
5.4 AVALIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS ESCAMAS DE ZEBRAFISH	44

5.5 AVALIAÇÃO OSTEOGÊNICA CORPÓREA DE ZEBRAFISH	47
5.6 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM AMOSTRAS DE SAGUE DE ZEBRAFISH	49
5.7 AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DE ESTRÔNCIO EM AMOSTRAS DE ÁGUA EM 24 HORAS	55
CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO GERAL	57
CAPÍTULO 7. CONCLUSÃO	59
CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO 1.....	79

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é a doença osteometabólica crônica mais comum da atualidade, acometendo mais de 200 milhões de indivíduos em todo o mundo (COOPER, CAMPION & MELTON, 1992), destes, cerca de 10 milhões são brasileiros. Esta patologia se relaciona com vários fatores incluindo a menopausa e o envelhecimento, sendo caracterizada pela fragilidade óssea e alterações na sua microarquitetura (GALI, 2001), que tem como desfecho clínico mais importante a ocorrência de fraturas, que em sua maioria são classificadas como de baixo risco. Com isso, a osteoporose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um agravante da saúde pública, sob o CID10 – M80 - M85 (BRASIL, 2008).

Como forma de prevenir fraturas e de minimizar alterações da microarquitetura óssea, diversos compostos terapêuticos vêm sendo desenvolvidos, entretanto, os que tem apresentado uma melhor eficácia, apresentam custo elevado e normalmente não são distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), tornando o tratamento pouco acessível para os indivíduos de baixa renda. Ainda, os efeitos colaterais causados pelo uso destes compostos e suas interações medicamentosas (observadas quando o indivíduo realiza tratamento para outras doenças que podem ou não estar relacionadas a osteoporose), também podem influenciar na continuidade ou descontinuidade do tratamento, podendo agravar o quadro clínico (MARTINS *et al.*, 2009; DE MORAES *et al.*, 2013).

Desta forma, a presente dissertação versa sobre o tema “Estrôncio nanocarreado na remissão de quadro semelhante à osteoporose em Zebrafish (*Danio rerio*)”, visando o desenvolvimento de um composto com eficácia significativa, baixo custo e efeitos colaterais reduzidos. Para tal, propomos inicialmente avaliar a eficácia desta nova estratégia em modelo experimental, tendo como instrumentos de análise técnicas histoquímicas, citoquímicas e analíticas, que permitiram avaliar a presença ou não de baixa massa óssea, e/ou presença de cálcio nos modelos, e iniciar o estudo sobre a dinâmica e influência de elementos químicos, tais como o estrôncio.

Os ensaios apresentados nesta dissertação, foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais – CEUA/UFMG sob o protocolo 388/2018 (Anexo 1).

1.1 ROTEIRO DA DISSERTAÇÃO

Uma revisão da literatura é apresentada no Capítulo 2, com foco no processo de remodelação óssea, tratamento da osteoporose e metodologias de avaliação dos tratamentos em Zebrafish. Já o Capítulo 3, contém os objetivos gerais e específicos desta Dissertação. Os Capítulos de 4 a 6, apresentam os materiais e métodos, resultados obtidos pelas diferentes técnicas experimentais utilizadas durante a execução desse trabalho e sua discussão. As diferentes metodologias foram realizadas nos Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Escola de Veterinária, Escola de Farmácia, Escola de Engenharia e no Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

No Capítulo 4, são descritos os materiais e métodos utilizados para a produção e caracterização do nanomaterial fosfatado contendo estrôncio, e para avaliação de quadro semelhante a osteoporose, seguido pelo tratamento utilizando formulação contendo estrôncio. Já o Capítulo 5, exibe os resultados e a discussão, tendo como foco a avaliação osteogênica das escamas, a distribuição corporal de complexo radiomarcador e a avaliação das concentrações séricas de elementos químicos nos grupos experimentais, e a depuração de estrôncio em animais saudáveis e com quadro semelhante a osteoporose, tratados com nanomaterial fosfatado contendo estrôncio (NPM-Sr).

O Capítulo 6 apresenta uma discussão geral, o capítulo 7 as conclusões e o capítulo 8 as perspectivas desta dissertação.

O CEUA está em anexo (ANEXO 1).

CAPÍTULO 2. REFERENCIAL TEORICO

2.1 FORMAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo pode ser formado por 2 processos que se iniciam na fase embrionária, o intramembranoso que é característico de ossos laminares e consiste na formação do osso entre lâminas membranosas preexistentes (centros de ossificação primários), devido a mineralização da porção conjuntiva, pela diferenciação de células mesenquimais precursoras, em osteoblastos e posteriormente em osteócito (FIG.2.1.1) (GARTNER & HIATT, 2007).

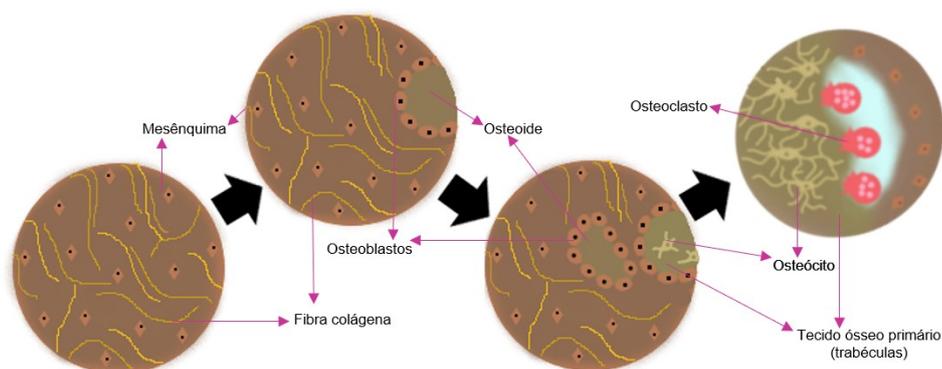


FIG.2.1.1 - Formação óssea intramembranosa. Adaptado de GARTNER & HIATT, 2007.

Já a ossificação endocondral, inicia-se a partir da formação de um molde constituído por uma matriz cartilaginosa sintetizada por condrócitos, que são as células responsáveis pelo crescimento da cartilagem (a partir de sucessivas divisões mitóticas), que serão o molde do futuro tecido ósseo (FIG.2.1.2) (GARTNER & HIATT, 2007; AGHAJANIAN & MOHAN, 2018).

No período pós-natal, ambos processos resultarão em matrizes mineralizadas devido a deposição de minerais sobre a superfície sintetizada por osteoblastos. Os elementos celulares que compõem essa matriz extracelular, são células especializadas como: osteoblastos - células responsáveis pela síntese da porção

orgânica da matriz óssea; osteócitos - osteoblastos que ficaram retidos dentro de lacunas circundadas pela matriz orgânica sintetizada pelos seu precursor; e osteoclastos - células responsáveis pela absorção da porção orgânica e mobilização da porção inorgânica, composta principalmente por fosfato de cálcio, e contendo também, estruturas celulares como perióstio, endóstio e canal medular (STANDRING *et al.*, 2010). Com o crescimento do indivíduo o tecido ósseo é moldado e se este estiver em homeostase, o tecido adquire características de um osso maduro.

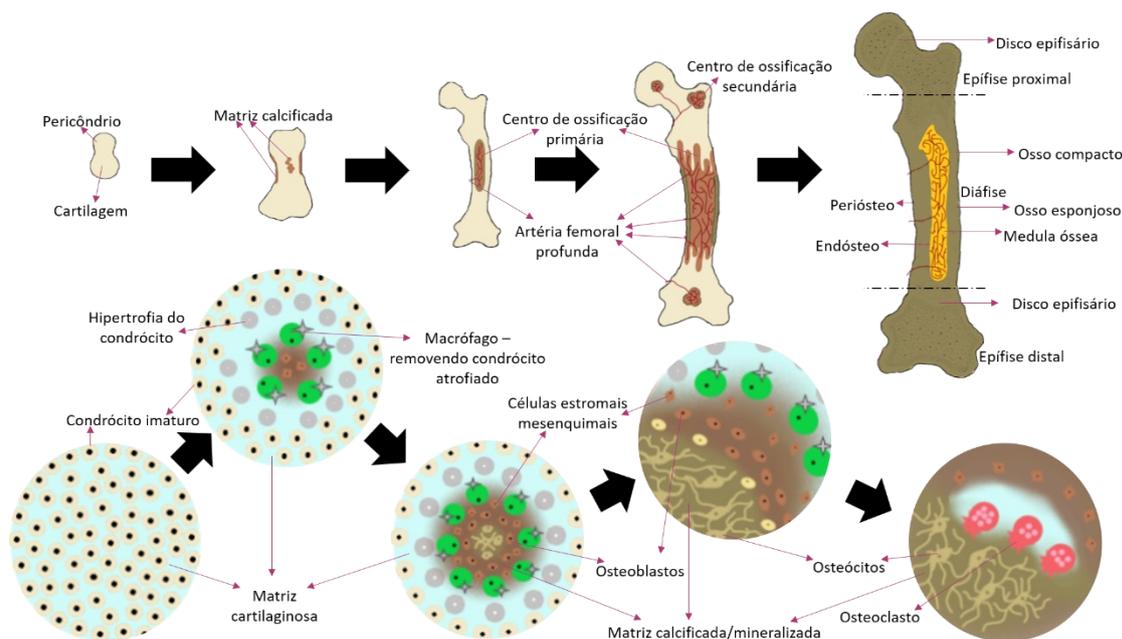


FIG.2.1.2 - Formação óssea endocondral. Adaptado de AGHAJANIAN & MOHAN, 2018.

Dois sistemas são essenciais para o desenvolvimento e crescimento dos ossos, são eles: a modelagem que está relacionada ao crescimento e adaptação mecânica, e o remodelamento que é responsável pela remoção e reparo do osso danificado (RAGGATT & PARTRIDGE, 2010).

O remodelamento ósseo ocorre através de atividade catabólica para remoção de porções lesionadas e neoformação de tecido através de neossíntese (SIMS & MARTIN, 2014), resultando respectivamente, na reabsorção da superfície interna do osso, que é revestida por um endóstio mais delgado, e aposição na superfície externa, que é revestida por uma camada fibrocolagenosa condensada, o perióstio; ambas camadas, são ricas em células osteoprogenitoras e outros tipos celulares essenciais para a renovação e homeostase do tecido (STANDRING *et al.*, 2010).

Estes processos se distinguem quanto a sua velocidade nos diferentes grupos de vertebrados. Em humanos adultos, o processo leva cerca de 10 anos para ser concluído, uma vez que a taxa de absorção e formação óssea é calculada entre 5 e 10% ao ano, sendo que a absorção leva 3 semanas e a resposta de formação de 3 a 4 meses (PARFFIT, 1980).

2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea é um processo assíncrono, definida por dois estágios distintos que acontecem em diferentes porções anatômicas do esqueleto, conhecidas como unidades básicas multicelulares (UBMs). O primeiro processo é a reabsorção óssea mediada por osteoclastos multinucleados, e o segundo é a formação óssea mediada por osteoblastos, subsequentemente com a deposição de minerais (HATTNER *et al.*, 1965).

Estes processos em conjunto permitem que porções do esqueleto com microfraturas e/ou deficiências estruturais, sejam substituídas, impedindo o desenvolvimento de macrofraturas ósseas (SÖZEN, ÖZİŞİK & BAŞARAN, 2017). Mas para que isso ocorra de forma homeostática, é necessária que a rede de comunicação celular entre células da linhagem osteoclástica responsáveis pela absorção, e as células da linhagem osteoblástica responsáveis pela formação óssea, estejam em equilíbrio no indivíduo e em cada UBM (SIMS & MARTIN, 2014), seja esta comunicação celular por intermédio de mediadores secretados pelas linhagens celulares citadas, pelo contato direto entre essas linhagens ou moduladas pela influência hormonal (tais como: hormônio da paratireoide (PTH), esteroides, calcitonina e outros) (FURUYA *et al.*, 2018).

De modo geral, o remodelamento ósseo envolve uma cascata de sinalizações, no qual a primeira fase é a ativação do processo de remodelamento, que é estimulado pela detecção de um sinal como a tensão mecânica ou ação hormonal, que induz a liberação de fatores como RANKL por osteócitos e osteoblastos, promovendo o início

do recrutamento de pré-osteoclastos até as UBM's (PARFFIT, 1980; MURTHY, MORROW & THERIAULT, 2009).

Em seguida com a fusão dos pré-osteoclastos formando os osteoclastos maduros e liberação de fatores como Nectin-1 por estes, a matriz óssea começa a ser reabsorvida por uma combinação de enzimas lisossômicas e íons hidrogênio, formando as lacunas de Howship de reabsorção óssea (RUSSOW *et al.*, 2019) e conseqüentemente induzindo a formação de novos osteoclastos, ocorrendo a remoção de remanescentes de colágeno e preparação da superfície, para posterior formação óssea mediada por osteoblastos.

Na fase de reabsorção, também são liberadas SLIT3 por osteoclastos e SEMA3a pelos neurônios; estas duas moléculas controlam negativamente a reabsorção óssea, entretanto, sua atividade nesse momento é reduzida (IQBAL *et al.*, 2018).

Entre a reabsorção e a formação óssea, existe a fase de reversão que é marcada pelo início da diminuição na expressão de moléculas relacionadas a reabsorção celular, e um aumento das associadas a formação óssea (SLIT3, SEMA3a, OPG, TGF β , IGF-1 dentre outras), resultando na apoptose de osteoclastos e elevação na migração de células mesenquimais precursoras de osteoblastos, dando início a fase de formação, onde osteoblastos maduros iniciam a síntese de uma nova matriz orgânica, que servirá como base para a deposição de minerais (TAKANA, NAKAYAMADA & OKADA, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2016; IQBAL *et al.*, 2018).

A fase de terminação pode ser dividida em duas etapas: (1) a mineralização ocorre pelo aprisionamento dos osteoblastos dentro de lacunas circundadas pela matriz orgânica sintetizada pelos mesmos, tendo como consequência de seu aprisionamento sua diferenciação em osteócitos (células responsáveis pela comunicação celular no tecido ósseo), além da deposição de minerais sobre a matriz em torno destas células, (2) e a fase de quiescência que é marcada pela homeostase tecidual, onde a quantidade de osso reabsorvido foi substituída por completo (RAGGATT & PARTRIDGE, 2010; KIM *et al.*, 2018; IQBAL *et al.*, 2018) (FIG.2.2.1).

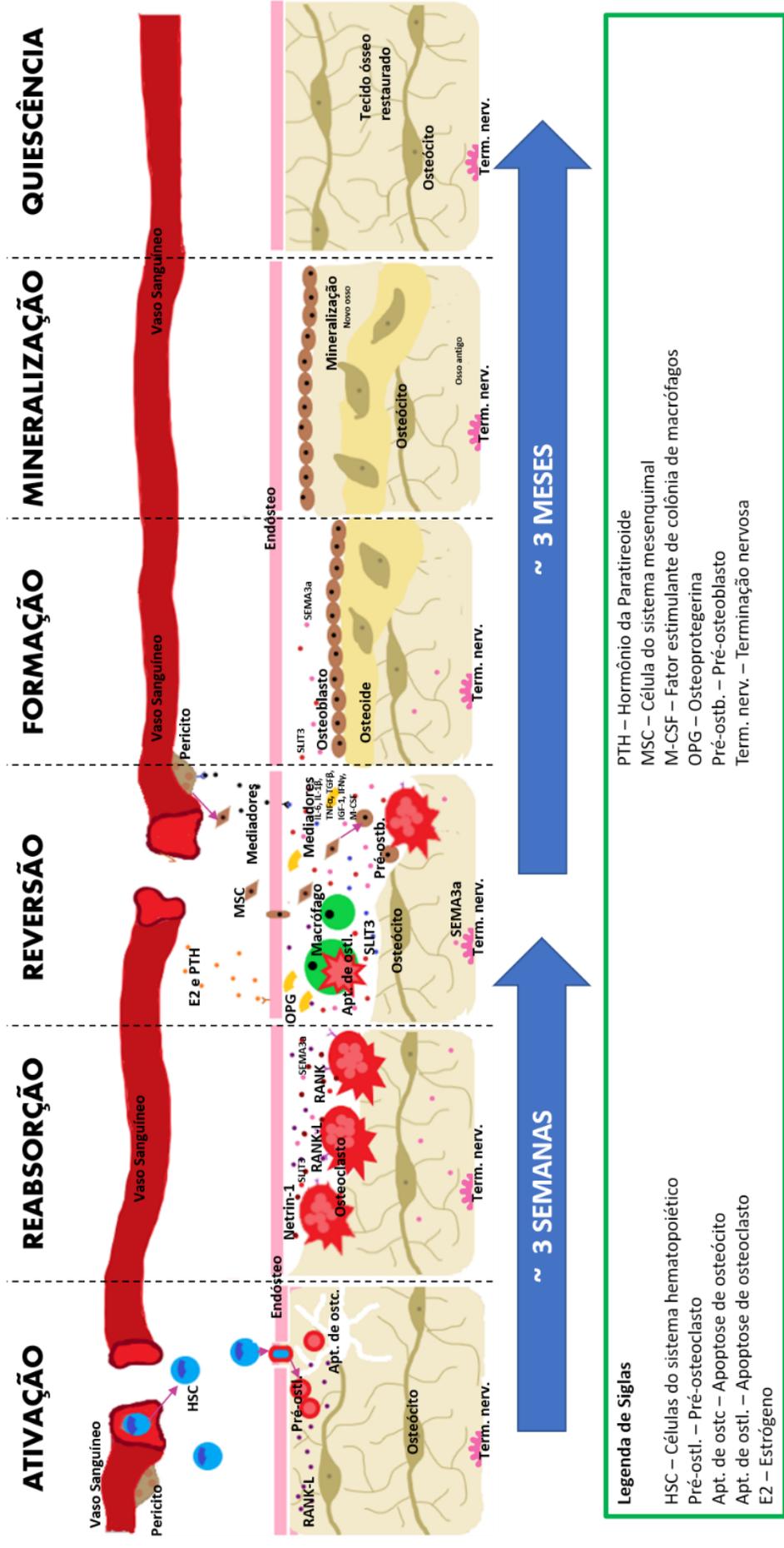


FIG.2.2.1 - Os principais elementos celulares, hormonais e estruturais envolvidos na remodelação óssea. Adaptado de PARFFIT, 1980; TANAKA, NAKAYAMADA & OKADA, 2005; MURTHY, MORROW & THERIAULT, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2016; IQBAL *et al.*, 2018.

O remodelamento que ocorre naturalmente é benéfico para a saúde óssea, mas quando associado a fatores como a menopausa e a idade avançada, impactam negativamente sobre o turnover ósseo, tendo como consequência o aumento do risco de fratura (SÖZEN, ÖZİŞİK & BAŞARAN, 2017). Outro efeito do envelhecimento, é a redução da síntese de proteínas, o que diminui a produção da parte orgânica da matriz óssea levando a um acúmulo da parte inorgânica, tornando o osso rígido e quebradiço, formando uma estrutura frágil e assim elevando a propensão à fratura. Além disso, a perda óssea associada à idade, está criticamente relacionada ao comprometimento da capacidade dos megacariócitos, em apoiar a proliferação de osteoblastos devido a regulação negativa do TGF- β (MAUPIN *et al.*, 2019).

Desta forma é possível proferir, que os processos de formação e remodelação óssea envolvem uma cascata de eventos teciduais, e que durante estes processos a estrutura óssea pode sofrer alterações metabólicas que podem conferir a ela características indesejáveis, como por exemplo, o desenvolvimento da osteopenia caracterizada como grau leve de perda óssea, ou osteoporose (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002).

2.3 OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea. É classificada como um dos principais problemas de saúde pública, tendo como causa distúrbios que acometem a microarquitetura óssea, podendo resultar em aumento da porosidade tornando o osso mais susceptível a fraturas (GALI, 2001; JAMA, 2001; VUORI, 2001; BORELLA, SOUZA, KOESTER, 2006; BORGES & NEGREIROS, 2013; EMKEY, EPSTEIN, 2014; SORIANO *et al.*, 2014; AZIZIYEH *et al.*, 2019). Dizer que este distúrbio é o resultado da perda óssea acelerada em todos os casos é um equívoco, uma vez, que indivíduos jovens podem vir a desenvolvê-la como consequência de déficits no metabolismo ósseo durante a infância (JAMA, 2001).

Esse agravante da saúde pública, afeta mais de 200 milhões de indivíduos em todo o mundo (COOPER *et al.*, 1992; KANNIS, 2007), sendo estimado que mais de 10 milhões de brasileiros sejam osteoporóticos (MORAES *et al.*, 2014). As fraturas mais graves do ponto de vista clínico, epidemiológico e econômico, são as vertebrais e colo femoral, uma vez, que estas estão associadas a elevadas taxas de comorbidade (BANDEIRA & CARVALHO, 2007). Em adendo, um estudo realizado por Aziziyeh (*et al.*, 2019), contabilizou que os gastos anuais do Brasil com tratamento de fraturas, chegaram à 310 milhões de dólares no ano de 2018. Logo, tratamentos que visem minimizar estes gastos são essenciais para a economia do país e bem-estar da população.

O cálcio é o principal elemento químico encontrado no tecido ósseo, e uma desregulação elevando sua deposição sobre esse tecido, por exemplo, pode causar a formação de calos ósseos ou esporas, causando dor e interferência nos movimentos. Por outro lado, se essa desregulação afeta a via de deposição por uma exacerbação do processo de reabsorção óssea ou uma diminuição na absorção de íons cálcio (Ca^{2+}) pelo organismo, também haverá o enfraquecimento dos ossos, tornando-os frágeis e sujeitos a fraturas (BORGES & NEGREIROS, 2013; AZIZIYEH *et al.*, 2019).

Deste modo, é importante que cada indivíduo tenha uma dieta com valores ideais de cálcio, e que consuma/produza de acordo com sua faixa etária e localização global os valores ideais de vitamina D, visto que essa é essencial para a absorção intestinal de Ca^{2+} (RADOMINSKI *et al.*, 2017).

Vários fatores além da ingestão adequada de Ca^{2+} e vitamina D, influenciam no resultado da remodelação óssea. A produção de hormônios e o estágio da linhagem osteoblástica que está participando da remodelação óssea naquela UBM (SIMS & MARTIN, 2014), também são cruciais, uma vez, que a osteoclastogênese não é estimulada pelas mesmas células que produzem a matriz óssea (RODAN & MARTIN, 1981; 1982); inclusive, as perturbações moleculares que levam ao quadro osteoporótico, estão associados ao atraso na cicatrização de fraturas e a regeneração óssea prejudicada (RUSSOW *et al.*, 2019). Estes fatores subdividem a osteoporose em tipos específicos descritos na seção Quadro Clínico.

2.3.1 Quadro Clínico

Atualmente o quadro clínico da osteoporose pode ser classificado de acordo com o exame de Densitometria Mineral Óssea (DMO), onde é preconizado que se o desvio padrão (utilizado para estabelecer o valor de T-Score), variar entre -1 e -2,5 o paciente exibe um quadro de osteopenia, e quando este valor é inferior a -2,5 o paciente é osteoporótico (WHO, 1994) (FIG.2.3.1-a).

Tal avaliação é realizada através da comparação dos dados obtidos pela densitometria de regiões ósseas padronizadas, como vertebrae, úmero e fêmur (PAPAIOANNOU *et al.*, 2010; COSMAN, 2019) do paciente, em relação a um indivíduo controle do mesmo sexo e idade.

Também pode ser utilizado de forma complementar para classificação e obtenção de informações como a propensão de fraturas, a Ferramenta de Avaliação de Risco de Fratura (FRAX), que leva em consideração a densidade mineral óssea, a presença ou ausência de fraturas e fatores hereditários (EASTELL *et al.*, 2019) (FIG.2.3.1-b).

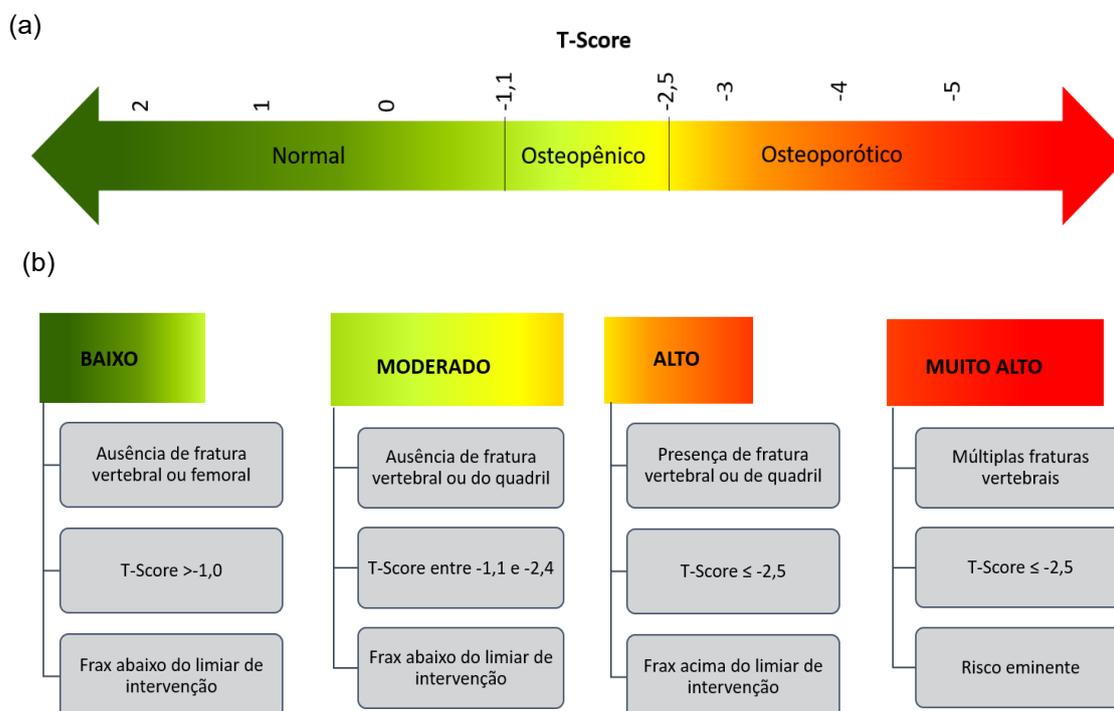


FIG.2.3.1 - (a) Valores de referência para a DMO. Adaptado de TeleDensitometria, 2018; (b) Classificação de risco de fratura de acordo com a técnica do FRAX. Adaptado de EASTELL *et al.*, 2019.

Ambas as técnicas são importantes para se estabelecer o tratamento do indivíduo, e assim minimizar o risco de fraturas desencadeadas por essa patologia.

A osteoporose em adultos foi descrita por Gali (2001), como podendo ser classificada em primária ou secundária, sendo que a forma primária (idiopática) pode ser subdividida em tipo I e II. O tipo I – pós-menopausa, ocorre preferencialmente em mulheres, sendo caracterizada por uma rápida perda óssea que predominantemente atinge o osso trabecular (BORELLA, SOUZA, KOESTER, 2006), ocorrendo em função da redução de estrógeno, resultando no aumento de mediadores (IL-6, IL-1, TNF), influenciando positivamente na atividade de osteoclastos por inibição do seu processo apoptótico, elevando as concentrações sistêmicas de Ca^{2+} e reduzindo o PTH (RAMALHO & LAZARETTI-CASTRO, 1999; GRACITELLI *et al.*, 2002). Já o tipo II – senil, acomete indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 70 anos (PISTELLI *et al.*, 2014).

Já a osteoporose secundária, está relacionada a transtornos endócrinos, digestivos, celulares e processos inflamatórios (PATRÍCIO, *et al.*, 2006; SORIANO *et al.*, 2014; PASQUALETTI, *et al.*, 2015; BORRELLI, 2018), podendo estar associado ou não ao uso de fármacos, como por exemplo, os glicocorticoides (PISTELLI *et al.*, 2014), sendo geralmente acometidos, indivíduos do sexo masculino com idade igual ou superior a 65 anos (SORIANO *et al.*, 2014).

Em crianças e adolescentes esse distúrbio é denominado de juvenil, estando comumente associado a osteoporose secundária, tendo sido descritos indutores relacionados a transtornos celulares, endócrinos, digestivos, respiratórios, neuropsiquiátricos, hereditários e ao uso de alguns fármacos (CAMPOS, *et al.*, 2003; LIEN, *et al.*, 2003; BORRELLI, 2018).

2.4 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Borella, Souza e Koester (2006), listaram em seu trabalho abordagens para o tratamento deste agravante de saúde. São descritas:

- A suplementação com sais de Ca^{2+} , uma vez que esse elemento é um dos principais constituintes da matriz óssea;
- A administração de vitaminas D e K, que estimulam a ligação de Ca^{2+} à matriz óssea, favorecendo sua mineralização. Entretanto, ambos são terapeuticamente ineficazes se utilizados isoladamente, visto que a mineralização da matriz óssea depende de outros fatores biológicos, estruturais e metabólicos tais como: as atividades osteoclasticas, liberação de citocinas e equilíbrio hormonal;
- Cirurgias como vertebroplastia e cifoplastia, consideradas minimamente invasivas, solucionam o problema apenas pontualmente;
- Drogas como bifosfonatos, a exemplo, o alendronato de sódio (AL) ($\text{C}_4\text{H}_{13}\text{NNaO}_7\text{P}_2$ – $272.05 \text{ g/mol}^{-1}$) que atuam como inibidores da reabsorção óssea, alterando a viabilidade de osteoclastos. Entretanto, apresentam reações adversas como úlceras faringolaríngeas (SAKAIDA *et al.*, 2017) e osteonecrose mandibular (EIKEN *et al.*, 2017; CHIU *et al.*, 2018).

Além dessas novas abordagens terapêuticas utilizando-se hormônios, anticorpos monoclonais e Sr^{2+} vem sendo desenvolvidas, são exemplos, a Teriparatida, o Denosumab e o Ranelato de Estrôncio (RE – teve sua fabricação pela empresa Servier suspensa em 2017), respectivamente. Todas estas abordagens têm como finalidade inibir a osteoclastogênese ou estimular a osteoblastogênese, funcionando como tratamentos anabólicos ou antirreabsortivos (FIG.2.4).

2.4.1 Terapias Ósseas Anabólicas

Elas se baseiam na indução da formação óssea por intermédio de agentes farmacológicos, como o uso diário de PTH ou de seus análogos comerciais, como abaloparartida ou teriparatida (RUSSOW *et al.*, 2019), ou anticorpos monoclonais como romosumab (COSMAN, 2019).

A vantagem dessa terapia, está na rápida redução da incidência de fraturas vertebrais e não vertebrais, como consequência do aumento da osteoblastogênese e da DMO (HERNANDEZ *et al.*, 2019). De forma complementar, estudos têm demonstrado que a associação de terapias anabólicas com antirreabsortivas tem gerado bons resultados a longo prazo (COSMAN, 2019; CHENG; WENTWORTH & SHOBACK, 2020).

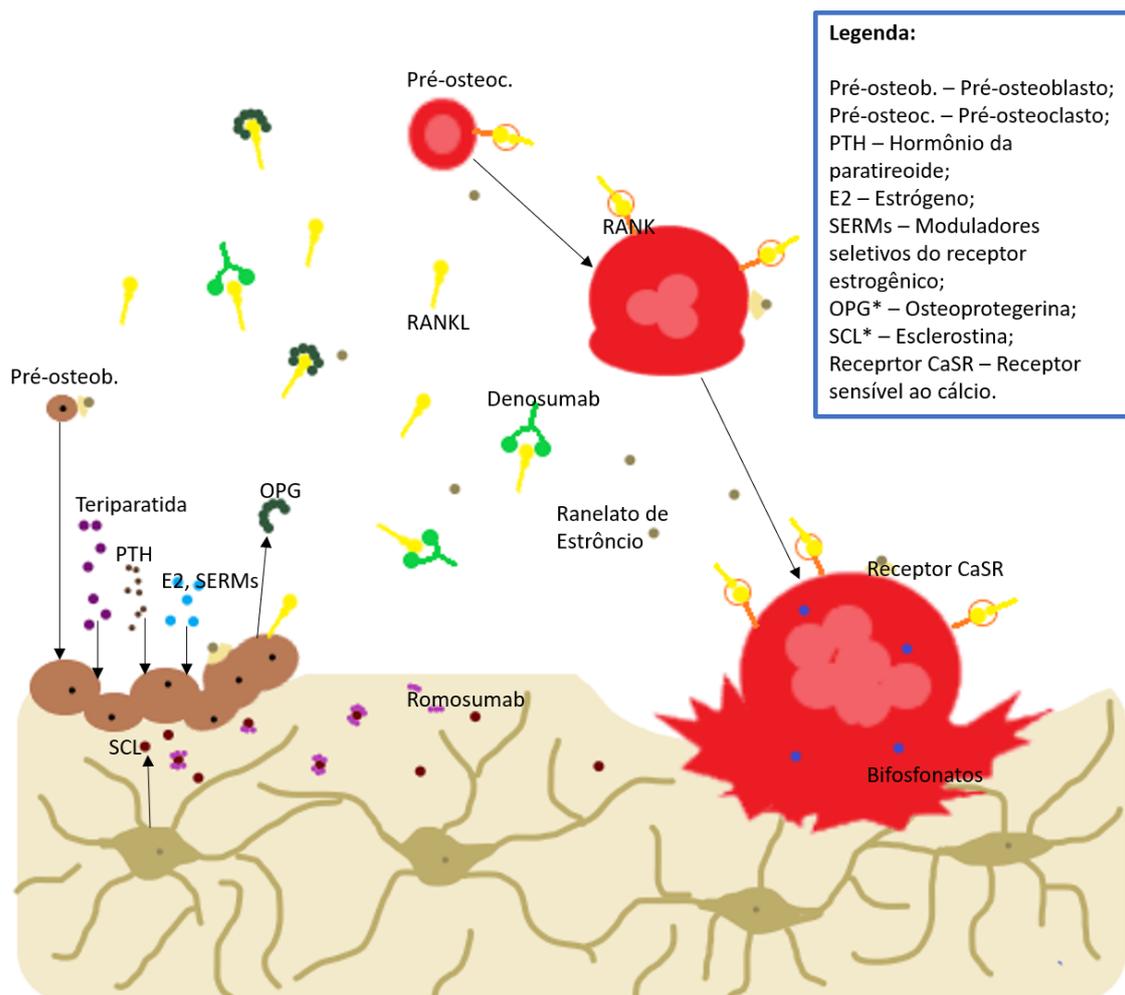


FIG.2.4.1 -Abordagens terapêuticas. Adaptado de BRENNAN *et al.*, 2009; HANLEY *et al.*, 2012; CONNELLY, 2016.

2.4.1.1 Teriparatida

A teriparatida assim como a abalopartida, é um análogo do PTH de uso diário ou semanal, que atua sobre os receptores de PTH presentes na membrana de osteoblastos e osteócitos (LEDER, 2018). O PTH é o principal regulador da homeostase de Ca^{2+} em mamíferos, sendo essencial para a mobilização deste elemento do tecido ósseo para o espaço extracelular. No fígado atua na via de síntese da vitamina D, o que facilita a absorção de Ca^{2+} através do trato gastrointestinal. Nos túbulos renais otimiza a reabsorção de Ca^{2+} (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Seu uso por período intermitente (18 - 24 meses) resulta em uma ação anabólica, promovendo a proliferação de pré-osteoblastos (COSMAN, 2019). Para

que seu efeito não seja revertido, é necessário fazer o uso de agente farmacológico alternativo para se manter a DMO adquirida (COSMAN *et al.*, 2014).

2.4.1.2 Romosumab

O romosumab é um anticorpo monoclonal de uso mensal, que se liga a esclerostina (SCL), inibindo que está se ligue as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e a receptores celulares, afetando negativamente na via de sinalização Wnt- β -catenina, atuando assim como um formador ósseo (LIM & BOLSTER, 2017; COSMAN, 2019; RUSSOW *et al.*, 2019).

Seu uso em associação com terapias antirreabsortivas tem se mostrado eficaz (McCLUNG, 2018), o que é mais um indício de que a associação de terapias anabólicas e antirreabsortivas, podem promover melhora à homeostase do tecido ósseo.

2.4.2 Terapias Ósseas Antirreabsortivas

Elas têm como princípio a redução da osteoclastogênese, por intermédio da redução da reabsorção óssea sem influenciar na osteoblastogênese (COSMAN, NIEVES & DEMPSTER, 2017; NICHOLS & PAVLOVIC, 2018). Alguns exemplos de agentes antirreabsortivos são: a reposição de estrógeno (E2), o uso de moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERMs), calcitonina, bifosfonatos e anticorpos monoclonais como o denosumab (CHEN & SAMBROOK, 2011; DA MATA, 2012).

Uma grande desvantagem dessa terapia, é a probabilidade de se desenvolver osteonecrose mandibular (RIBEIRO *et al.*, 2018; SHIBAHARA, 2019), devido ao tempo de uso do agente antirreabsortivo (CHEN & SAMBROOK, 2011).

2.4.2.1 Denosumab

O denosumab é um anticorpo monoclonal que se liga a RANKL, inibindo que está se ligue ao receptor RANK em pré-osteoclastos e osteoclastos maduros, afetando negativamente o recrutamento e diferenciação destes (HANLEY *et al.*, 2012; COSMAN *et al.*, 2014; RUSSOW *et al.*, 2019; CHENG, WENTWORTH & SHOBACK, 2020).

Se, e quando interrompido o tratamento com denosumab, é necessário fazer o uso de agente farmacológico alternativo para se manter a DMO adquirida (COSMAN *et al.*, 2014). Além disso, o uso deste fármaco em sequência a outro também tem demonstrado melhora no quadro clínico (CHENG, WENTWORTH & SHOBACK, 2020).

2.4.2.2 Alendronato de sódio

É o bifosfonato mais utilizado para o tratamento de primeira linha da osteoporose. Os bifosfonatos ficam embutidos na matriz óssea não penetrando dentro da membrana celular. Entretanto, no ambiente ácido formado pelos osteoclastos para degradação da matriz óssea, estes conseguem penetrar na membrana celular dos osteoclastos induzindo a apoptose (HANLEY *et al.*, 2012; CHENG, WENTWORTH & SHOBACK, 2020).

Embora os bifosfonatos e o denosumab apresentem bons resultados terapêuticos, ao mesmo tempo em que atuam minimizando os efeitos da reabsorção óssea, também impactam sobre a síntese da matriz, o que é um ponto crítico da terapia, limitando a ação anabólica desses medicamentos a uma janela de eficácia que não permite o tratamento a longo prazo (IQBAL *et al.*, 2018). Como ponto de solução desse quesito, o seu uso em sequência a um tratamento anabólico tem demonstrado melhoras do quadro clínico (CHENG, WENTWORTH & SHOBACK, 2020), o que indica que a combinação e sequência terapêutica em agentes anabólicos e antirreabsortivos são alternativas que devem ser analisadas mais profundamente, visto que esta proporcionaria uma maximização do efeito do tratamento.

2.4.3 Ranelato de Estrôncio

Nas últimas décadas o ranelato de estrôncio tem sido estudado devido ao efeito antirreabsortivo através da estabilização de Sr^{2+} na matriz óssea calcificada, uma vez, que apresenta aspectos como valência, raio iônico, possibilidade de absorção intestinal e assimilação a matriz óssea semelhante ao Ca^{2+} (SOUZA, 2010). É constituído por dois átomos de estrôncio estáveis e uma molécula de ácido ranélico, que devido a sua elevada polaridade, apresenta baixa absorção, distribuição e ligação às proteínas plasmáticas, não havendo indícios de acumulação ou de seu metabolismo em animais (SERVIER, 2015).

O ranelato de estrôncio atua elevando a expressão de mRNA de osteoprotegerina (OPG) em osteoblastos, além de reduzir a ativação do receptor do mRNA do ligante NFκB (RANKL), através de sua ação sobre o receptor sensível ao cálcio (CaSR). Além disso, ele regula positivamente a replicação, diferenciação e vida útil osteoblástica (BRENNAN *et al.*, 2009). Contudo, este composto teve seu registro de comercialização cancelado em dezembro/2018 (REIS, 2019; ANVISA, 2020), devido a incidência de doença cardíaca isquêmica, doença arterial periférica e doença cerebrovascular, associadas ao seu uso (EMA, 2014; INFARMED, 2014). Possivelmente estes efeitos estavam relacionados as elevadas concentrações sistêmicas de estrôncio.

2.5 ESTRÔNCIO

O estrôncio é um elemento alcalino-terroso, que apresenta grandes semelhanças com o cálcio, devido às suas propriedades de busca óssea (JIMÉNEZ *et al.*, 2019). Ele é encontrado na natureza como uma mistura de quatro isótopos estáveis: ^{84}Sr (0,56%), ^{86}Sr (9,86%), ^{87}Sr (7,02%) e ^{88}Sr (82,56%); já o ^{90}Sr é um isótopo radioativo, produzido somente em usinas nucleares, sendo sua ação sobre o corpo humano dupla, pois ele danifica os capilares sanguíneos e tem pouca afinidade a agentes quelantes. A concentração de Sr^{2+} estável no corpo humano é extremamente baixa, sendo sua absorção por dia entre 2 e 4mg, podendo variar de acordo com a latitude, longitude e dieta do indivíduo (PORS NIELSEN, 2004). Seus valores atômicos em relação ao cálcio são apresentados na tabela 2.5.1 (RSC, 2020).

Devido sua interação com os mesmos receptores que o Ca^{2+} , o Sr^{2+} compete com este, na absorção intestinal e na reabsorção renal, podendo em casos de superdosagem ser citotóxico para o organismo causando hipocalcemia (YBARRA, COSTA & FERREIRA, 2001). Sua depuração renal é três vezes maior que a de Ca^{2+} , o que diminui a quantidade total de Sr^{2+} circulante, e conseqüentemente a encontrada no esqueleto em relação ao Ca^{2+} em dosagens normais. Ambos são rapidamente excretados pelos rins após injeção intravenosa, e em casos de superdosagem, o Sr^{2+} é armazenado no tecido ósseo, nos retículos endoplasmáticos e sarcoplasmáticos de

células musculares, causando alterações nas funções fisiológicas da musculatura esquelética e cardíaca (PORS NIELSEN, 2004; HENDRYCH, OLEJNICKOVA & NOVAKOVA, 2016).

TAB.2.5.1 - Informações atômicas dos elementos químicos cálcio e estrôncio.

Elemento químico	Raio atômico, não ligado (Å)	Raio covalente (Å)	Afinidade eletrônica (kJ/mol ⁻¹)	Eletronegatividade (escala de Pauling)
Cálcio	2.31	1.74	2.369	1.00
Estrôncio	2.49	1.90	4.631	0.95

Um estudo *in vitro* demonstrou que doses entre 0,5 e 5 µg/mL de Sr²⁺, não são prejudiciais a mineralização óssea e não tornam a hidroxiapatita mais solúvel, enquanto, doses entre 20 -100 µg/mL são prejudiciais para a mineralização óssea, caracterizando-se a um quadro de osteomalácia, indicando uma relação dose-dependente do Sr²⁺ com a matriz óssea. Estes valores se assemelham as doses recomendadas de ranelato de estrôncio por dia entre 2 e 4 g (nível sérico de Sr²⁺ 10 a 20 µg/mL) para mulheres pós-menopausa (VERBERCKMOES, DE BROE & D'HAESE, 2003). Um outro estudo *in vitro*, demonstrou que doses de Sr²⁺ entre 25 e 500 µM, promovem uma diferenciação osteogênica de células tronco. Já doses mais elevadas, promovem a apoptose celular (AIMAITI *et al.*, 2017).

Também, o Sr²⁺ possui um efeito antirreabsortivo e anabólico (MARIE *et al.*, 2001), o que o torna um composto atraente para o desenvolvimento de fármacos. Relato de sua aplicação sob forma de cloreto de estrôncio (⁸⁹Sr), produzido pelo decaimento de um isótopo radioativo, demonstrou que em doses adequadas, este é capaz de reduzir a dor metastática óssea, em 70% das pacientes acometidos por câncer de mama metastático (OKADA *et al.*, 2018). Logo, podemos observar que os efeitos benéficos do Sr²⁺ estão dentro de uma janela terapêutica de baixa dosagem, o que abre caminho para aplicações deste dentro do espectro do nanocarreamento.

2.6 NANOCARREAMENTO EM FORMULAÇÕES BIOMÉDICAS

O primeiro emprego do termo nanotecnologia remete a uma palestra de Richard Feynman, apresentada na Caltech em dezembro de 1959. A partir deste marco, a nanotecnologia ganhou um amplo espaço não apenas no meio científico, mas também político, econômico e cultural, percebido sua aplicabilidade, como a de nanodispositivos médicos navegando pela corrente sanguínea e no desenvolvimento de processadores capazes de realizarem cálculos extremamente complexos com facilidade. Devido ao tamanho reduzido dessas estruturas, muitos cientistas não acreditavam ser possível que estas fossem aplicáveis. Entretanto, com o desenvolvimento dos nanotubos de carbono em meados da década de 90, essa incredulidade tendeu a ser reduzida (JONES, 2011). Com isso, novas pesquisas para o desenvolvimento de nanoestruturas se tornaram mais frequentes, sendo ainda necessário estabelecer os critérios para a classificação dos materiais, na descrição de nanopartículas e nanomateriais.

Os nanomateriais podem apresentar de acordo com Saleh (2020), propriedades físicas e químicas únicas, tais como: não serem visíveis em microscópios simples ou a olho nu, sendo necessárias técnicas microscópicas avançadas, elevada superfície em relação ao volume e alta porcentagem de átomos ou moléculas na superfície, o que leva a propriedades únicas. Já as nanopartículas de acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), são objetos em 3D que apresentam suas dimensões externas em nano escala, ou seja, com uma faixa de tamanho entre 1 e 100 nm.

Como os nanomateriais apresentam características físico-químicas ou biológicas, diferentes ou mais eficientes em comparação a seu constructo de maior escala (MOGHIMI, HUNTER & MURRAY, 2005; MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2005; FDA, 2014; KHAN, SAEED & KHAN, 2019), isso tem os tornado extremamente atraentes do ponto de vista clínico, sendo amplamente utilizados na fabricação de cosméticos, biomarcadores e para o tratamento farmacológico.

O tamanho reduzido dos nanomateriais facilita sua translocação em barreiras orgânicas, como pele, tecidos e órgãos do corpo. Alguns tipos podem alterar

negativamente a viabilidade celular e causar estresse oxidativo irreversível, danos às organelas, reações alérgicas e perturbações fagocíticas (JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

Biologicamente o mecanismo de aplicação destas, pode variar do uso cutâneo, oral ao intravenoso, sendo este último o mais interessante do ponto de vista clínico, uma vez que, os nanomateriais entregues sistemicamente, têm acesso direto a quase todas as partes do corpo, e, portanto, têm maior potencial de influenciar nos resultados clínicos (ANSELMO & MITRAGOTRI, 2016).

Essas estruturas são extremamente diversas tanto em tamanho, quanto morfologia e propriedades químicas, o que torna possível subdividi-los em diferentes grupos, tais como baseados em carbono, lipídios, metais, cerâmicas, polímeros, semicondutores (KHAN, SAEED & KHAN, 2019), fosfatados e outros diversos tipos. Dentro desse aspecto, a nanomedicina tem como base metodológica, o uso de estruturas nanométricas que se assemelhem ou interajam com estruturas celulares, a fim de se desenvolver estratégias para o diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (MOGHIMI, HUNTER & MURRAY, 2005).

Os nanomateriais inorgânicos fosfatados (NPMs), vêm recebendo atenção considerável como veículo de entrega de drogas, devido à sua alta captação celular, baixa toxicidade e baixa resposta imune, bem como serem tipicamente mais hidrofílicos, biocompatíveis e estáveis em comparação com materiais orgânicos (PAUL & SHARMA, 2012). Por causa de suas várias características favoráveis, certos tipos de NPMs têm sido usados em aplicações como a entrega de plasmídeos de DNA (TONELLI *et al.*, 2015, 2016), administração de antibióticos como a vancomicina para prevenção de infecções após artroplastia de joelho (RADIN *et al.*, 1997) e no uso como transportador na administração oral e absorção intestinal de insulina em ratos diabéticos (PAUL & SHARMA, 2012). Esses diversos exemplos de aplicações, revelam o potencial para novas abordagens terapêuticas no tratamento de diferentes patologias (ALVARENGA, 2015).

Na comunidade de pesquisa de materiais biomédicos, é descrito que o fosfato de cálcio sob forma amorfa, pode ser adsorvido e assimilado mais facilmente pelos organismos vivos para produzir novo tecido ósseo, do que os fosfatos de cálcio

cristalizados, como a hidroxiapatita (HU *et al.*, 2007), com a vantagem de que, o cálcio é um dos principais constituintes da matriz óssea. Além disso, diversas pesquisas veem demonstrando que a interação entre o fosfato de cálcio sob forma amorfa e outros constituintes da matriz óssea, como o ácido hialurônico, ou mesmo fármacos tem melhorado o remodelamento ósseo (HU *et al.*, 2007; CAI & TANG, 2008; ALGHAMDI *et al.*, 2014; VAN, 2016; CHU *et al.*, 2017; CHEN, KAWAZOE & CHEN, 2018; KIM *et al.*, 2018).

2.7 MODELO EXPERIMENTAL

Neste projeto foram utilizados Zebrafish adultos (*Danio rerio*), como modelo experimental.



FIG.2.7.1 - Zebrafish (*Danio rerio*).

Conhecido popularmente como Zebrafish ou Paulistinha, o *Danio rerio*, é um teleósteo de água doce originário do sul da Ásia, exibindo um amplo espectro reprodutivo e de sobrevivência em águas da zona tropical. Apresenta um tamanho quando adulto variando entre 3 e 5 cm e peso entre 0,11 e 2 g, e atinge maturidade reprodutiva após 3 meses de eclosão, tendo dimorfismo sexual marcante, expectativa de vida entre 2 e 4 anos e alta produção de ovos pelas fêmeas, que após serem fecundados se mantem translúcidos, o que permite a avaliação do desenvolvimento dos embriões, sendo amplamente utilizados em testes de biossegurança de novos fármacos (SPENCE *et al.*, 2008; DAMMSKI *et al.*, 2011). Além disso, têm seu genoma totalmente sequenciado, apresentando aproximadamente 70% de similaridade com o

genoma humano (HOWE *et al.*, 2013), o que o torna um candidato para o desenvolvimento de estudos translacionais para patologias humanas (PHILLIPS & WESTERFIELD, 2014). Tais características tornaram este teleósteo, um atrativo modelo experimental para o teste de novas técnicas terapêuticas (SIEBEL & BONAN, 2015; LEE *et al.*, 2017).

O uso do Zebrafish (*Danio rerio*) em ensaios para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos de doenças humanas, vem aumentando ao longo dos anos. Geneticamente o Zebrafish se tornou um organismo popular para esse tipo de estudo de função gênica de vertebrados, devido a facilidade de acessar todas as etapas embrionárias e da habilidade de se acelerar os estudos gênicos de lockdown ou super expressão, levando a um amplo uso do Zebrafish como importante modelo no estudo de função gênica e doenças genéticas humanas (GOLZIO *et al.*, 2012; PANIZZI *et al.*, 2012 & ROSCIOLI *et al.*, 2012).

Em estudos envolvendo a osteoporose nesse modelo, a indução de quadros osteopênicos e/ou osteoporóticos descritos, são obtidos pelo uso da prednisona, um fármaco de fácil acesso. Esses trabalhos demonstram a capacidade de se desenvolver um quadro de perda óssea, facilitando assim, o estabelecimento de teste de novas estratégias terapêuticas com esses animais (PASQUALETTI *et al.*, 2015; VRIEZE *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2019).

A prednisona é um dos glicocorticoides mais indicados para o tratamento de diversos problemas de saúde, como doenças alérgicas, endócrinas, neoplásicas, respiratórias, reumáticas e outras que respondam à terapia de corticosteroides, sendo seus mecanismos de ação em humanos bem conhecido (FIG.2.7.2).

Entretanto, seu uso para a indução de um fenótipo semelhante a osteoporose, demonstrou em larvas de Zebrafish entre 10 e 20 dias pós-fertilização, uma alteração na via de sinalização da adesão focal e na matriz extracelular, aumentando a atividade de osteoclastos e da via de sinalização NFκB (HUO *et al.*, 2018). Além disso, análises em escamas de Zebrafish adultos demonstraram que a matriz mineralizada dessas é reduzida (PASQUALETTI *et al.*, 2015; VRIEZE *et al.*, 2015).

2.9 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE AVALIAÇÃO

2.9.1 Avaliação utilizando complexo radiomarcador $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$

O ^{99m}Tc (tecnécio) é um radiotraçador, obtido a partir do decaimento isotópico do ^{99}Mo (molibdênio) por decaimento beta. Uma de suas utilidades, é o traçamento do medronato, vulgarmente conhecido como difosfato de metileno (MDP - um dos menores bifosfonatos utilizados para o tratamento de várias doenças ósseas (RODAN & FLEISCH, 1996) e utilizado para o imageamento ósseo e articular) (CANER *et al.*, 1992; KOBAYASHI, JELICKS & FINO, 2013), uma vez que o MDP tem semelhança estrutural ao cálcio e uma alta afinidade pelos receptores da osteocalcina (SOARES *et al.*, 2016), expressa preferencialmente por osteoblastos, indicando uma provável interação deste bifosfonato com a osteocalcina, para seu transporte até a matriz óssea (NEVE, CORRADO & CANTATORE, 2012).

Uma técnica aplicável para tal avaliação é a tomografia por emissão de pósitrons (PET), uma vez, que o MDP associado ao ^{99m}Tc tem um tempo de distribuição e ligação com seus receptores relativamente alto (ANDREU, ELKINGTON & WILES, 2012). A técnica de PET apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, permitindo assim, quantificações precisas (DE BARROS *et al.*, 2012). Além desta, uma outra técnica amplamente utilizada é a cintilografia óssea, que depende tanto do fluxo sanguíneo local quanto da atividade osteoblástica (DE ABREU, *et al.*, 2005).

O ^{99m}Tc emite raios gama com a energia de 140 keV e possui uma meia-vida de 6 horas, tornando-o um ótimo agente de diagnóstico em cintilografia óssea (MAKRIS *et al.*, 2016), visto que a associação $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$ liga-se especificamente, e se acumula, no osso mostrando as alterações atribuídas a osteogênese, quantificadas pela emissão gama (COLE, VARGO-GOGOLA & ROEDER, 2016). Esta associação também possui uma rápida depuração, bem como alta excreção urinária, o que resulta em um maior contraste entre tecido e osso (BLAKE *et al.*, 2001), tornando-os bons marcadores para o diagnóstico de doenças ósseas.

2.9.2 Avaliação das concentrações séricas de elementos químicos

A avaliação de elementos químicos nos sistemas biológicos, é extremamente necessária para o diagnóstico e tratamento de doenças, e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam eficazes, visto que alterações nas concentrações de determinados elementos, podem ser um sugestivo para alterações funcionais do organismo, sendo um indício para processos inflamatórios (HOTA, VIJAYAN & SINGH, 2001; GRUBER *et al.*, 2020). Baseando-se nisso, o emprego do raio X se faz uma alternativa para o imageamento não apenas de órgãos, mas também, de elementos presentes no sangue como o Se e Ca, já que essa técnica permite excitar os átomos dos elementos químicos ao ponto de ser possível a visualização de seus movimentos pelas camadas eletrônicas (HOTA, VIJAYAN & SINGH, 2001). Para tal análise, é utilizada a técnica de espectrometria de fluorescência de raio X de reflexão total (TXRF), que é uma variação da fluorescência de raio X dispersiva em energia (EDXRF) (MISRA & SINGH MUDHER, 2002).

Utilizando-se a técnica de TXRF é possível realizar testes de biotoxicidade para avaliar os potenciais efeitos provocados por substâncias químicas, sendo uma ferramenta útil para a avaliação e identificação de componentes dissolvidos em soluções (BILO *et al.*, 2015); desse modo, é possível avaliar pequenas massas/volumes, permitindo fazer análises tanto em baixas concentrações de fluídos quanto em animais de pequeno porte, como por exemplo embriões de Zebrafish (SZOBOSZLAI *et al.*, 2009; BILO *et al.*, 2015; GRUBER *et al.*, 2020).

2.9.3 Avaliação das concentrações de estrôncio na água

Sabendo-se que o estrôncio apresenta uma meia-vida de cerca de 60 horas, que sua eliminação é independente da dose/tempo, seu clearance plasmático é cerca de 12 mL/min e o renal de 7 mL/min (SERVIER, 2015) em humanos, e que o principal mecanismo de excreção dos peixes é a partir das brânquias e rins, sendo que em alguns casos, a pele também pode apresentar uma porcentagem significativa na excreção (BOMBARDELI, MEURER & SYPPERRECK, 2003), a avaliação da taxa de excreção de compostos é de extrema importância para a avaliação da taxa de depuração, sendo a avaliação das concentrações de estrôncio na água em curto prazo, uma metodologia que possibilita a visualização da excreção ou não de

compostos utilizados nos tratamentos, que pode abrir caminho para avaliações mais amplas e/ou específicas.

Pensando nisso, utilizamos Zebrafish adultos saudáveis e exemplares que apresentavam fenótipo semelhante a osteoporose induzida pelo uso de prednisona como modelo de pesquisa óssea (VRIEZE *et al.*, 2014; MACRAE & PETERSON, 2015; GEURTZEN & KNOPF, 2018). Adicionalmente neste trabalho, procuramos avaliar o desenvolvimento e a remissão deste quadro, a partir do tratamento com formulação contendo estrôncio nanocarreado, visando a ampliação de sua meia-vida biológica, ampliando assim, sua biossegurança terapêutica a qual inclui a redução do número doses para a manutenção das concentrações necessárias à sua eficácia, baseando-se nos resultados promissores que diversos grupos de pesquisa tem apresentado com a utilização de nanopartículas no tratamento de doenças parasitárias, processos de transfecção e tratamento de câncer (THOMAS *et al.*, 2011; TONELLI, *et al.*, 2015; 2016 & CAPELETTI *et al.*, 2019)

Ciente do potencial terapêutico do estrôncio e as limitações associadas as interações medicamentosas, custo, posologia etc., neste projeto sugerimos desenvolver um protocolo de ampliação do efeito antirreabsortivo utilizando modelo Zebrafish, incluído de nova formulação contendo estrôncio nanocarreado, visando avaliar de forma geral aspectos básico relevantes para ensaios mais específicos e futuras aplicações.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de nanomaterial fosfatado como carreador de estrôncio, visando o estabelecimento de nova estratégia terapêutica na remissão de quadro semelhante à osteoporose em Zebrafish (*Danio rerio*) após 7 dias

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 4:

- Desenvolver e avaliar os materiais, metodologias analíticas e terapêuticas aplicados nesta dissertação.

Capítulo 5:

- Caracterização físico-química e morfológica do nanomaterial fosfatado contendo estrôncio (NPM-Sr), através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura, microanálise de raio X elétron dispersiva (EDXMA) e espectrômetro de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS);
- Confirmar o desenvolvimento de quadro semelhante a osteoporose, e os potenciais efeitos remissivos dos tratamentos com ranelato de estrôncio e NPM-Sr, através da biodistribuição de cálcio em escamas pela técnica Alizarina red S, e distribuição de osteoclastos através de técnica citoquímica para determinação da atividade da enzima TRAP;
- Comparar a distribuição dos centros de ossificação (osteoblastos) no tecido ósseo, utilizando-se a técnica de radiomarcagem e imageamento não invasivo com ^{99m}Tc /MDP nos diferentes tratamentos;

- Comparar as concentrações séricas dos elementos químicos presentes no sangue dos animais, após serem submetidos aos diferentes tratamentos, utilizando TXRF;
- Comparar a concentração excretada de estrôncio em animais saudáveis e osteoporóticos desafiados com NPM-Sr.

CAPÍTULO 4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DOS NANOMATERIAIS FOSFATADOS CONTENDO ESTRÔNCIO

Os processos de sínteses dos nanomateriais fosfatados (NPMs) foram realizados no Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA), no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esses são intelectualmente protegidos em dois registros de patentes, sob os números: BR 102.012.032.493-8 e BR 102.013.032.731-0 disponível em www.inpi.gov.br.

Para a síntese do composto, foi utilizada uma mistura de soluções de sais em um sistema de precipitação controlada, utilizando-se sais de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Cromoline, Brasil), $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{SSr}_2$ (Cromoline, Brasil), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Synth, Brasil), utilizando um sistema aquoso contendo membrana semipermeável (Spectrum Medicaí Industries, Inc). Após o período de síntese de 24 horas, a suspensão aquosa contendo NPMs foi centrifugada a 3500 rpm, durante 10 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com etanol absoluto (Merck, Brasil) e seco a 60°C durante 48 horas. Alíquotas de 1 mg por frasco de cada NPM, foram mantidas em microtubos de polipropileno cônicos e esterilizado com 25 kGy de irradiação gama no Laboratório de Irradiação Gama - LIG (CDTN) antes do uso.

4.1.1 Caracterização Físico-química

Para determinação da composição elementar e morfológica, alíquotas de 10 μL de solução estoque de NPM-Sr (1 mg/mL em água mili-Q), foram depositadas sobre lamínula de carbono (Termanox®), secas ao ar, metalizadas a vácuo (10^{-5} mBar) com carbono no evaporador Hitachi (modelo HUS4G) e analisadas nos microscópios eletrônicos de varredura, com sistema de microanálise de raio X integrado JEOL JSM 6360LV, localizado no Centro de Microscopia da UFMG, sendo adquiridas imagens por elétrons secundários, utilizando-se ampliações de 9.500x empregando

aceleração eletrônica de 30 keV. A sua composição química foi determinada a partir do espectro obtido por microanálise de raio X elétron dispersiva (EDXMA), baseando-se em feixe de elétrons colimados nas estruturas nanométricas, operando a 15 keV, com tempo de acumulação total de 90 segundos.

A determinação do diâmetro, potencial zeta (ζ) e condutividade foi obtida no equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern), do Laboratório de Biofísica Molecular, ICB-UFMG. Nestes casos, foram utilizados 20 μ L da solução estoque de NPM-Sr (1 mg/mL em água mili-Q) elevados em 2 mL de água destilada, dentro de cubetas. As leituras foram registradas após a homogeneização, seguidas da estabilização das amostras.

4.2 PROCESSOS DE INDUÇÃO COM PREDNISONA E DESENHOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Avaliações físico-químicas da água em ensaios de manutenção

Para este estudo foram seguidas as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE 203, 2019). Avaliamos os parâmetros físico-químicos de Temperatura em °C (termômetro Boyu analógico BT-1), para pH, cloro total dissolvido (Cl), carbonato de cálcio (KH), dióxido de carbono (CO₂), amônia total (NH₃), nitrito (NO₂) e oxigênio dissolvido (O₂) utilizou-se kits Alcon Labcon Test. Essas avaliações foram realizadas em todos os experimentos de ensaios biológicos.

4.2.2 Processamento metodológico dos materiais biológicos analisados

Esse ensaio foi repetido diversas vezes, visando fornecer material suficiente para as análises subsequentes. Neste, utilizamos um n total = 40 exemplares de Zebrafish adultos (*Danio rerio*) do tipo selvagem, pesando em média $0,277 \pm 0,05$ g e com comprimento médio de $3,7 \pm 0,3$ cm, divididos em 4 aquários ($n = 10$ indivíduos por grupo, sendo 5 machos e 5 fêmeas) com 2,1L de água e mantidos a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os 10 animais do grupo controle (CT), não foram expostos a prednisona e tratados. Os demais (30 animais), foram submersos 24 horas antes do início dos tratamentos (T₋₁) a solução aquosa contendo 25 µM ou 8,9607 mg/L de prednisona (prednisolone-21-phosphate, Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A), como protocolado por Vrieze (*et al.*, 2014), a fim de se obter indivíduos com fenótipo semelhante a quadro osteoporótico, (controle positivo - PN) a serem desafiados com os tratamentos com nanomaterial contendo estrôncio (NM-Sr) e o tratamento com a solução de ranelato de estrôncio (R-Sr) 517,52 g/mol (C₁₂H₆N₂O₈SSr₂ – PROTOS, Les Laboratoires Servier Industrie).

Vinte e quatro horas após o período de indução (T₀), todos os animais (*n* = 40) foram acondicionados em sistema semi-estático renovando-se 1/3 da água a cada 24 horas, seguidas das análises físico-químicas nos tempos experimentais T₋₁, T₂ e T₅ (FIG.4.2.1a).

Os tratamentos nos grupos NM-Sr e R-Sr foram iniciados após 24 horas (T₀). Para isso, os animais foram contidos com a redução da temperatura da água (17 °C) e com auxílio de uma rede de nylon. As injeções foram realizadas na cavidade celomática, utilizando-se seringas de insulina de 31 gauge (0,25 mm, BD Ultra-Fine™), contendo volume de 10 µL por dose. O grupo NM-Sr recebeu dose única (T₀) intracelomática, de uma suspensão aquosa, contendo 10 µg/10 µL obtida a partir de uma suspensão estoque (1 mg/mL de NPM-Sr). Já o grupo R-Sr foi submetido ao mesmo procedimento de contenção e recebeu 3 doses intracelomáticas de solução contendo ranelato de estrôncio, na concentração de 173 µg/10 µL por dose (LI et al., 2009) nos tempos T₀, T_{3dias} e T_{6dias} (FIG.4.2.1a e b).

Ao final de T_{7dias}, a mortalidade de todos os grupos foi registrada e o sangue coletado (FIG.4.2.1c), a fim de se determinar possível efeito agudo do ensaio. Foram analisadas estruturas ossificadas das escamas (4.2.2.1.1), análise corporal por cintilografia (4.2.2.1.2) e análise de elementos químicos presentes no sangue (4.2.2.1.3).

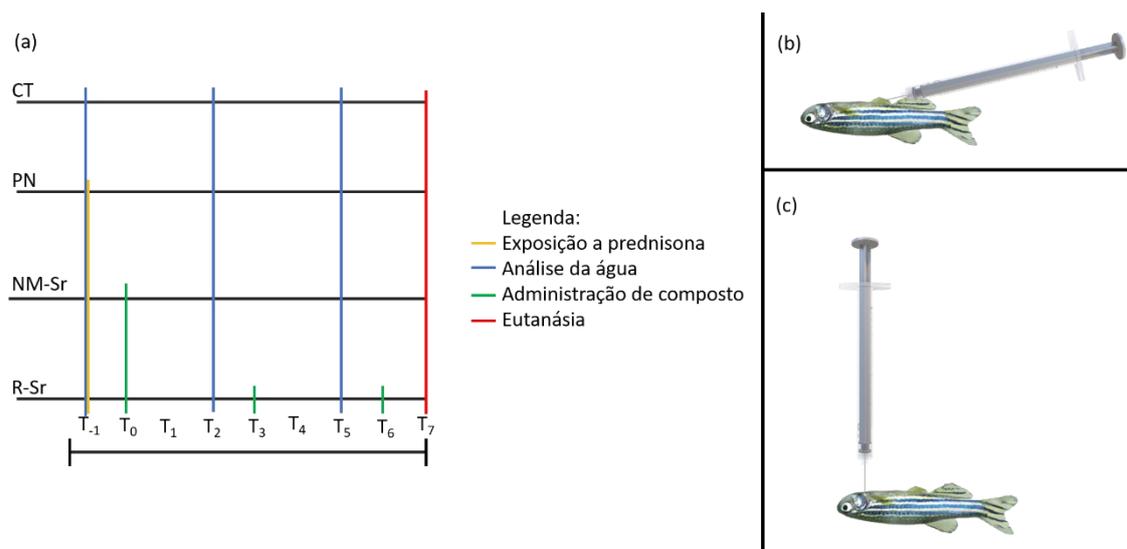


FIG.4.2.1 - Metodologia de desenvolvimento de protocolo. (a) desenho experimental; (b) processo de injeção e (c) coleta de sangue.

4.2.2.1 Avaliação de quadro osteoporótico, atividade osteogênica e elementar em Zebrafish

A avaliação do quadro osteoporótico, seguiu-se a obtenção de dados histoquímicos adquiridos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, controle (CT), osteoporótico sem tratamento (PN), osteoporótico submetido a nanomaterial contendo estrôncio (NM-Sr) e osteoporótico submetido ao tratamento com ranelato de estrôncio (R-Sr). Após 7 dias, estes foram submetidos a técnica histoquímica de alizarina red S, citoquímica para análise da atividade da enzima fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) e com a utilização de marcação radiológica para caracterização macro esquelética. Além disso, tiveram amostras de sangue retidas (aproximadamente 10 μ L por animal) para análise das concentrações séricas de elementos químicos.

A lâminas submetidas a análises citoquímicas e histoquímicas, foram analisadas morfometricamente quanto à intensidade e área de marcação, obtendo-se dados a respeito da distribuição do cálcio (indicador de mineralização) das mesmas. Para a sugestiva de aumento da atividade osteoclástica, a análise morfométrica das áreas de reabsorção em escamas aplicamos a técnica citoquímica para fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP). A avaliação do efeito sobre toda a estrutura óssea do modelo experimental foi acessada com a utilização da técnica associando o MDP

a radionuclídeo ^{99m}Tc o qual permite identificar a distribuição por emissão de radiação gama de centros de ossificação sugestivamente relacionada a centros concentradores de osteoblastos ativos. O detalhamento metodológico segue abaixo.

4.2.2.1.1 Avaliação osteogênica das escamas de Zebrafish

Ao final do experimento ($T_{7\text{dias}}$), cerca de 10 escamas foram removidas da porção lateral anterior de cada animal, de cada grupo experimental (CT, PN, NM-Sr e R-Sr) com auxílio de pinça cirúrgica e mantidas em tubos cônicos devidamente identificados contendo solução aquosa de álcool 70%. Após serem depositadas sobre lâmina histológicas, um valor mínimo $n = 30$ escamas passaram ao processo de coloração com vermelho de alizarina, e um $n = 35$ escamas foram submetidas ao método citoquímico TRAP.

- Alizarina red S

Para evidenciar a distribuição de cálcio nas escamas, as lâminas de cada indivíduo foram coradas por 10 minutos, utilizando técnica adaptada de Loiacomo (2010). Após as escamas secarem ($n = 5$ escamas por animal) sobre lâminas histológicas em estufa a 60°C por pelo menos 24 horas, essas foram coradas por 10 minutos em solução aquosa contendo 0,1% de alizarina red (Sigma, Brasil) (0,02 g em 2 mL de água destilada), seguida por 3 lavagens em água destilada, e posterior remoção de pigmentos lipídicos, gotejando-se solução de peróxido de hidrogênio a 20% (Reagen, Brasil) e lavadas em água destilada.

- TRAP

Para evidenciar a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato nas escamas, submetemos as lâminas obtidas conforme descrito anteriormente a método citoquímico adaptado de Pasqualetti (*et al.*, 2015). Lâminas histológicas ($n = 5$ escamas por animal) foram pré-incubadas em temperatura ambiente em 2 mL de solução aquosa contendo 5% de sacarose, 20 mM de tartarato de sódio (Synth, Brasil) em 0,1 M de tampão acetato (Synth, Brasil) pH 5,2 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, foram incubadas em câmara úmida por mais 1 hora, em solução contendo para cada 0,5 mL de água destilada, 1% de sulfato de sódio (Synth,

Brasil), 1 mM de Beta-glicerol fosfato (Sigma, Brasil) e 2 mM de nitrato de chumbo (Pb (NO₃)₂) (Dinâmica, Brasil). Em seguida as foram lavadas 3 vezes em água destilada.

Depois de prontas, as escamas das técnicas citadas acima foram analisadas em microscópio óptico eclipse E1 (Nikon), com sistema de aquisição de imagens Axican (Zeiss). As imagens digitalizadas obtidas com objetiva de 10x, foram calibradas com régua micrométrica e processadas para a análise morfométrica, sob forma de %médio da área de marcação e intensidade média, utilizando-se os programas computacionais ImageJ (FIJI), Excel (Microsoft) e Prims5 (GraphPad).

4.2.2.1.1 Avaliação osteogênica corporal de Zebrafish

Os animais foram divididos em 4 grupos: CT, PN, NM-Sr e R-Sr, contendo um total de 8 animais cada, e mantidos em tanques com capacidade para 4,25L de água contendo 25 µM de prednisona diluído em um volume igual a 2,1L, assim como preconizado por (Vrieze *et al.*, 2014), com trocas diárias de 1/3 do volume total de água. O processamento deles para as injeções ocorreu assim como descrito na seção 4.2.2 deste capítulo.

Para a obtenção das imagens e dados da partição do ^{99m}Tc+MDP, os exemplares de cada grupo foram anestesiados em 2 momentos: (i) sedação leve em solução contendo 50 µL de eugenol (Biodinâmica, Brasil) em 100 mL de água destilada, adaptada de Grush (NOAKES & MOCCIA, 2004), para aplicação de injeção celomática contendo 10 µL de ^{99m}Tc/MDP em uma taxa de marcação igual a 3 µCi em formulação adaptada de Zhao (*et al.*, 2012); e (ii) 1 hora após a injeção contendo ^{99m}Tc/MDP, foi realizada uma nova anestesia em solução adaptada de Grush (NOAKES & MOCCIA, 2004) contendo 700 µL de eugenol (Biodinâmica, Brasil) em 100 mL de água destilada e os animais foram levados para a câmara de cintilografia a raios gama (Nuclide), para obtenção da imagem. O equipamento foi calibrado para realizar análise de dados a partir de uma fonte de radiação de ^{99m}Tc, com um período de coleta de radiação por imagem de 300 segundos, em uma matriz de 256x256x16 e uma orientação do animal em um eixo de 90°. Após a obtenção das imagens, os animais foram eutanasiados em solução também adaptada de Grush (NOAKES & MOCCIA, 2004), contendo 2 mg de eugenol (Biodinâmica, Brasil) em 100 mL de água destilada, por 10 minutos.

4.2.2.1.3 Avaliação das concentrações séricas de elementos químicos

A terceira sequência de ensaios no mesmo molde, forneceu material a ser analisado por espectrometria de reflexão total por fluorescência de raio X (TXRF), a fim de se determinar as concentrações de elementos químicos presentes no sangue total após o período de 7 dias. Para isso, foram coletadas amostras de sangue dos animais utilizados no item 4.2.2.1.1 para retirada de escamas.

Ao final do período ($T_{7\text{dias}}$), após indução da eutanásia em água gelada ($0 - 4^{\circ}\text{C}$) e contenção física, houve a retirada de sangue através de punção cardíaca de $n = 5$ exemplares de cada grupo apresentado nesta dissertação. Para isso, foram utilizadas seringas 31 gauge (BD Ultra-Fine™) contendo $10 \mu\text{L}$ de EDTA a 10%, obtendo-se cerca de $10 \mu\text{L}$ de sangue para análise de TXRF. O sangue foi mantido em tubos cônicos e congelados, antes do procedimento de digestão ácida utilizando-se ácido nítrico a 5%. Um volume de $10 \mu\text{L}$ da solução resultante foi depositada sobre discos de quartzo (suporte de amostra) e levados para secar em estufa (TECNAL, modelo TE-394) a 60°C , por 15 minutos.

Após este período, o material foi analisado no equipamento S2 PICOFOX (Bruker Nano GmbH). O tubo de raio X com um ânodo de molibdênio (Mo) ($17,5 \text{ keV}$), foi operado a 50 kV e $600 \mu\text{A}$. Os raios X característicos, foram expostos utilizando um detector com janela de silício de 10 mm^2 , sob ar atmosférico. A resolução (largura meia altura), foi $<160 \text{ eV}$ para Mn $K\alpha$ 10 kcps , enquanto a janela de berílio tinha $100 \mu\text{m}$ de espessura. O tempo de excitação usado foi de 500 segundos. Avaliação de espectros e quantificação de elementos foram realizados com o software PICOFOX. Alguns parâmetros do espectrômetro foram avaliados e calibrado periodicamente para garantir a qualidade dos resultados: correção de ganho, resolução espectroscópica, sensibilidade e precisão da quantificação. O padrão interno utilizado foi gálio na concentração de 2 mg/L . Os elementos analisados foram expressos de acordo com as concentrações de cálcio (Ca), estrôncio (Sr), fósforo (P), potássio (K), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se), encontrados em cada animal dos grupos apresentados nesta dissertação.

4.2.3 Processamento metodológico para a determinação de remobilização e excreção de estrôncio em amostras de água em 24 horas

Para esta avaliação foram utilizados um n total = 12 animais (6 animais por grupo), a fim de se avaliar a excreção em curto prazo (24 horas) de indivíduos saudáveis (CT) e com fenótipo semelhante a quadro osteoporótico induzido pelo uso da prednisona (PN), ambos tratados com nanomaterial fosfatado contendo estrôncio (NPM-Sr). Para isso, os animais foram separados em 2 grupos e individualmente mantidos dentro de recipiente contendo 200 mL de água filtrada. Imediatamente antes de serem colocados nesses recipientes os animais normais e submetidos a prednisona foram injetados com solução contendo 10 µg/10 µL de NPM-Sr (ficando estabelecidos como grupos: CT^{+NPM-Sr} e NM-Sr) (ver FIG.4.2.1). Nos períodos de T_{1hora}, T_{3horas} e T_{24horas}, 1 mL de água de cada recipiente foram coletadas e como Controle Experimental (CE) amostras de água provenientes de aquários sem adição de animais, também foram amostradas. Após esse período, as amostras foram congeladas e posteriormente analisadas por ICP-MS utilizando um espectrômetro da Agilent Technologies (modelo 7700e), com câmara de nebulização de dupla passagem e nebulizador pneumático concêntrico. Para essa análise, as amostras foram acidificadas com (HNO₃) para obtenção de acidez final de 2% (v/v) e uma curva de calibração com mesma acidez foi preparada na faixa de 0 a 100 µg/L. As condições operacionais foram: potência do plasma de 1550 W, fluxo de gás auxiliar de 6 L/min, fluxo do gás de plasma de 15 L/min, fluxo do gás de nebulização de 1,09 L/min, modo "No Gas", isótopo ⁸⁸Sr.

4.2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram testados com o auxílio do programa GraphPad Prism5. Os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal, foram analisados utilizando os testes de Curva de Sobrevivência, One Way, teste t pareado e correlação de Pearson, e os que não apresentaram distribuição Gaussiana, avaliados pelo teste One Way: Kruskal-Wallis. O intervalo de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DE NANOMATERIAIS FOSFATADOS CONTENDO ESTRÔNCIO

A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que após secagem, os NPM-Sr se apresentam como agregados de partículas, sendo predominante (90%) o diâmetro desses agregados em 405,3 nm em suspensão aquosa, conforme obtido por espalhamento dinâmico de luz (FIG.5.1.1).

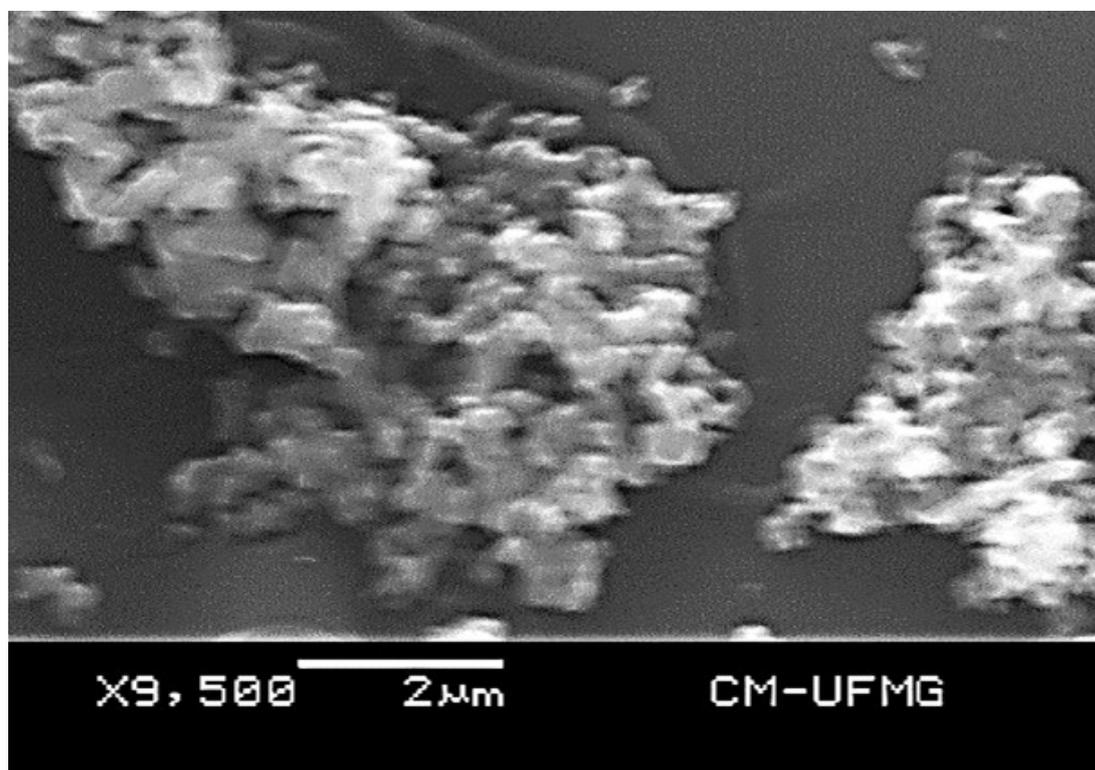


FIG.5.1.1 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura, demonstrando a morfologia dos NPM-Sr.

As análises no Zetasizer Nano Series forneceram informações sobre o potencial zeta (ζ), que foi de -33,7 mV e de condutividade em água de 0,0103 mS/cm. Além disso, o NPM-Sr apresenta características de um material amorfo, o que lhe confere uma importante propriedade para usos biomédicos, visto que materiais deste tipo, causam menor estresse oxidativo nas células e têm um aumento da mobilidade

celular, e conseqüentemente, de sua biodistribuição (HANCOCK & PARKS, 2000; SULCZEWSKI *et al.*, 2014).

O potencial ζ reflete o potencial de superfície das partículas, e influencia diretamente na estabilidade de dispersão destas, uma vez que, está relacionado as cargas elétricas presentes na superfície da estrutura, sendo que, quanto mais elevado o potencial, mais estável é a dispersão das NPs (MARIANO, DE OLIVEIRA & ASSIS, 2011; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Entretanto, para que a dispersão desta na solução seja eficiente, é necessário que o valor do potencial ζ , seja proporcional ao tamanho da NP.

Em um ensaio realizado por Mariano, (DE OLIVEIRA & ASSIS, 2011) observou-se que os valores de tamanho e potencial ζ da NP sintetizada pelo grupo que obteve melhores resultados, apresentava uma proporção de 2:1 (tamanho : potencial). Em adição, de acordo com Alves (2010), um potencial ζ de -33,94 mV, deve apresentar elevada estabilidade coloidal, uma vez que, à presença da dupla camada elétrica externa (camada de Gouy-Chapman), assim como, valores de condutividade (10,3 $\mu\text{S/cm}$) que se encontram entre os valores achados para água destilada (entre 0,5 a 3.0 $\mu\text{S/cm}$) (EMBRAPA, 2021) e água mineral (média 150 $\mu\text{S/cm}$) (FILHO, BRAZ & CHAGAS, 2016), sugerindo que estes complexos se apresentam em estado coloidal em meio aquoso e com significativa estabilidade estrutural devido a sua baixa dissolução, visto que o valor de 10 $\mu\text{S/cm}$ está mais próximo ao da água destilada.

Os resultados obtidos pela técnica de EDXMA, demonstram que o nanomaterial sintetizado por nosso grupo de pesquisa, se apresentava livre de elementos exóticos aos desejados, obtendo-se picos característicos de oxigênio (O), cálcio (Ca), magnésio (Mg), estrôncio (Sr) e fósforo (P), que são os elementos bases para a formulação do NPM-Sr.

A relação entre a altura dos picos de fósforo, cálcio e estrôncio sugerem significativa incorporação do estrôncio dentro do nanomaterial e ausência significativa de impurezas (FIG.5.1.2). A determinação de estrôncio no nanomaterial foi realizada pela técnica ICP-MS, obtendo-se uma concentração de 227 ± 12 mg/L de estrôncio, correspondendo a 22,7% da massa das NPM-Sr. Além disso, a distribuição de fósforo, oxigênio e magnésio (um importante elemento para as fases metabólicas da vitamina

D) (ZITTERMANN, 2013) e as demais características de condutividade, potencial ζ e aspecto amorfo do nanomaterial, permitem sugerir que este é poroso, e que as inserções de estrôncio na estrutura podem ter sido nas lacunas criadas por durante sua formulação, abrindo a possibilidade de inserções de outros elementos ou até mesmo materiais como micro RNAs (miRNAs) em seu interior, transformando este, em um carreador específico e/ou de ampla utilização, podendo-se tratar diferentes quadros clínicos com um único composto que apresenta associações adequadas e com ampla eficiência.

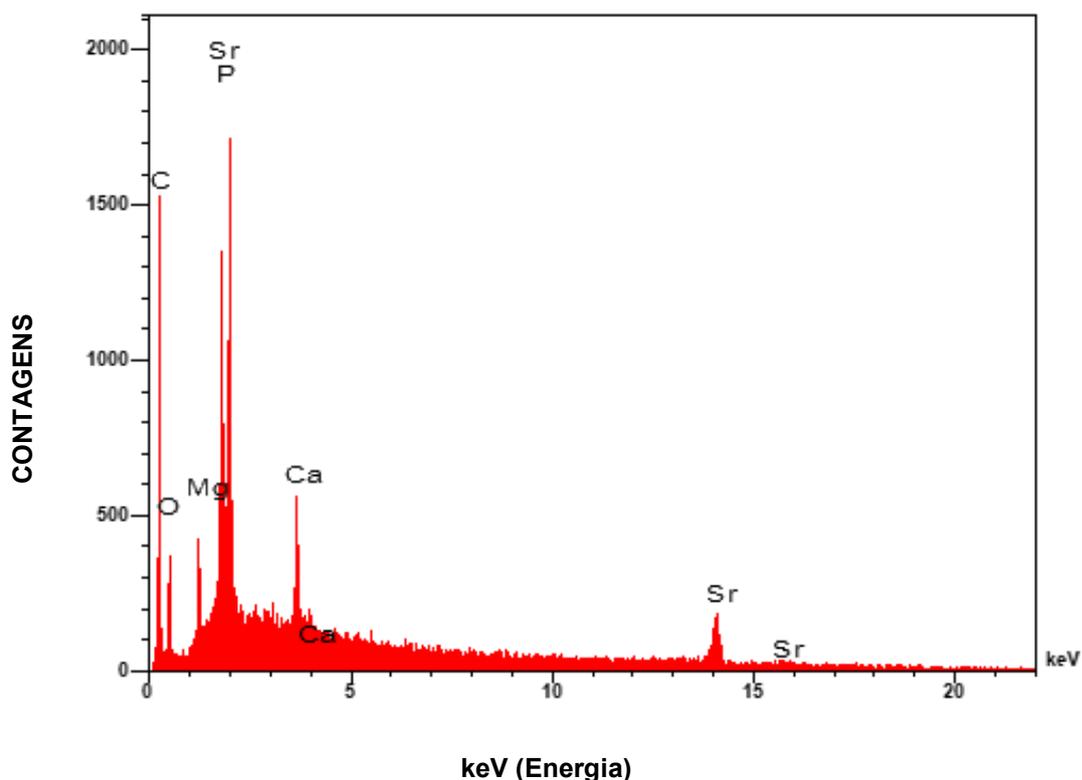


FIG.5.1.2 - Espectro de microanálise de raio X (EDXMA) obtido após colimação de feixe eletrônico sobre NPM-Sr, demonstrando presença de oxigênio, cálcio, estrôncio e fósforo. O carbono observado tem origem na metalização e base de Termanox necessários à análise.

5.2 AVALIAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA EM ENSAIOS DE MANUTENÇÃO

Os valores para os parâmetros físico-químicos obtidos pelas análises da água dos experimentos: ensaio para avaliação das escamas – 8 dias (TAB.5.2.1), ensaio

para avaliação da biodistribuição de $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$ – 8 dias (TAB.5.2.2) e ensaio de excreção em curto prazo – 24 horas (TAB.5.2.3), demonstram que a qualidade do ambiente seguiu as especificações estabelecidas pela OCDE 203 (2019), durante todo o período experimental.

TAB.5.2.1 - Parâmetros físico-químicos da água dos aquários de acordo com o grupo e o tempo de análise, para o ensaio de escamas e de elementos químicos encontrados em amostras de sangue, em um período de 8 dias.

GP	T	Físico				Químicos			
		°C	Cl	pH	KH	CO ² ppm	O ² ppm	NH ₃ total ppm	NO ₂ ppm
CT	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.000	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.009	0.25
	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	4	7.50	11.0	0.009	0.25
PN	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.25
	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	4	7.50	11.0	0.032 ^a	0.25
NM-Sr	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.25
	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	4	7.50	11.0	0.032 ^a	0.25
R-Sr	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.25
	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	4	7.50	11.0	0.032 ^a	0.25

nd – não detectável;

^a diferença estatística significativa entre os grupos, para teste não paramétrico, com distribuição gaussiana (teste Kruskal-Wallis), com nível de significância $p < 0,05$.

TAB.5.2.2 - Parâmetros físico-químicos da água dos aquários de acordo com o grupo e o tempo de análise, em um período de 8 dias.

GP	T	Físico				Químicos			
		°C	Cl	pH	KH	CO ² ppm	O ² ppm	NH ₃ total ppm	NO ₂ ppm
CT	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.000	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	5	9.30	11.0	0.009	0.25

PN	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.009	0.25
	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	5	11.20	11.0	0.032 ^a	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	6	9.30	11.0	0.032 ^a	0.25
NM-Sr	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.018 ^b	0.25
	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	5	9.30	11.0	0.032 ^a	0.25
R-Sr	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.018 ^b	0.25
	T ₋₁	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^a	0.0
	T ₂	26 ± 1	nd	7.2	5	9.30	11.0	0.032 ^a	0.25
	T ₅	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.018 ^b	0.25

nd – não detectável;

^{a, b} diferença estatística significativa entre os grupos, para teste não paramétrico, com distribuição gaussiana (teste Kruskal-Wallis), com nível de significância $p < 0,05$.

TAB.5.2.3 - Parâmetros físico-químicos da água dos aquários de acordo com o grupo e o tempo de análise, em um período de 8 dias.

GP	T	Físico				Químicos			
		°C	Cl	pH	KH	CO ₂ ppm	O ₂ ppm	NH ₃ total ppm	NO ₂ ppm
CE	T _{1h}	26 ± 1	nd	7.2	2	3.70	11.0	0.0	0.0
	T _{24h}	26 ± 1	nd	7.2	2	3.70	11.0	0.0	0.0
CT ^(+NM-Sr)	T _{1h}	26 ± 1	nd	7.2	5	9.30	11.0	0.0	0.0
	T _{24h}	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.022 ^a	0.25
NM-Sr	T _{-24h}	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.032 ^b	0.0
	T _{1h}	26 ± 1	nd	7.2	5	9.30	11.0	0.0	0.0
	T _{24h}	26 ± 1	nd	7.2	6	11.20	11.0	0.022 ^a	0.25

nd – não detectável;

^{a, b} diferença estatística significativa entre os grupos, para teste não paramétrico, com distribuição gaussiana (teste Kruskal-Wallis), com nível de significância $p < 0,05$.

Estes mesmos dados demonstram que a concentração de amônia nos grupos expostos a PR e tratados, apresentava-se superiores aos do controle ($\geq 0,018$ ppm) (TAB.5.2.4) sugerindo provável influência sobre o metabolismo do animal. Dados da literatura relatam que valores de GC (glicocorticoides) superiores a 8 ng/L geram efeito

negativos, tais como: morte e desenvolvimento patologias em peixes, como observado em muitos rios do mundo (DANIELS *et al.*, 2018; GONG *et al.*, 2019). Essas evidências indicam que peixes, reagem e são sensíveis a essas substâncias, podendo desenvolver diversos problemas, sendo um deles o quadro com fenótipo similar à osteoporose, o que é corroborado com os dados apresentados a seguir.

TAB.5.2.4 - Concentração de amônia e nitrito, em um período de 8 dias .

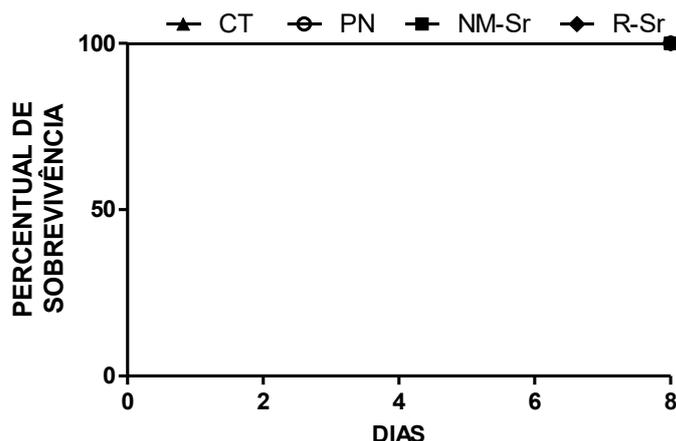
Ensaio	Grupos			
	CT	PN	NM-Sr	R-Sr
Amônia total (NH ₃)	0,006 ± 0,003	0,02 ± 0,004 ^a	0,02 ± 0,004 ^a	0,02 ± 0,004 ^a
Nitrito (NO ₂)	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,08

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método One Way: teste de comparação múltipla de Tukey's, seguido de teste t pareado, média ± erro padrão.

5.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

A taxa de sobrevivência durante o período experimental (T_{7dias} e T_{24horas}) em todos os ensaios, foi igual em todos os grupos, apresentando sobrevida em 100%, típico do gráfico (GRA.5.3.1).

Esses resultados sugerem que todos os compostos testados, não alteram a sobrevivência dos indivíduos testados. Tais resultados sugerem que o NPM-Sr, demonstra ser compatível com seu uso *in vivo* sem apresentação de morbididades. Resultado similar foi obtido por Tonelli (*et al.*, 2016) trabalhando com células embriogênicas de Tilápia-do-Nilo transfectadas com nanomaterial de matriz. Ainda que desprovido de Sr, formulação nanocarreadora baseada em fosfato desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa, já dispões de vários relatos sobre a sua biocompatibilidade em experimentos *in vitro*, demonstrado pela falta de alteração da viabilidade celular (em células do gânglio da raiz dorsal, macrófagos, cardiomiócitos etc. de camundongos) como os resultados obtidos por Tonelli *et al.*, (2015; 2016 & ALVARENGA *et al.*, 2015).



GRA.5.3.1 -Percentual de sobrevivência dos exemplares ao longo do tempo experimental ($T_{8\text{dias}}$). Nível de significância estatística $p < 0,05$ (*) conforme determinado por método de comparação de curva de sobrevivência - Log-rank (Mantel-Cox) test.

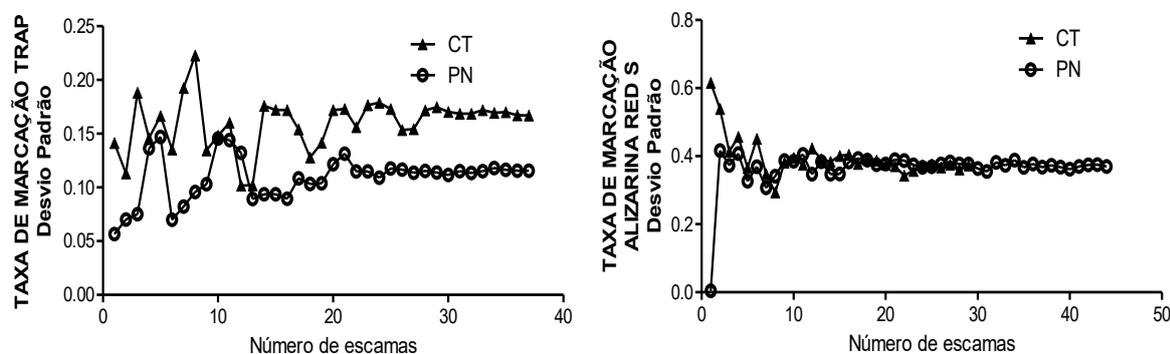
Dados de nosso laboratório mostraram que injeções intravasculares com NPM carreando antimetabólitos, antiparasitários, radiomarcadores e fluorescentes em outros modelos não influenciaram na sobrevivência de animais como camundongos, tilápias e Zebrafish. Desta forma, podemos sugerir que o NPM-Sr apresenta baixo impacto na sobrevivência de Zebrafish adultos, em um período de 7 dias, por injeção celomática, em uma concentração de $10 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ dose.

5.4 AVALIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS ESCAMAS DE ZEBRAFISH

Visto que o Zebrafish apresenta tamanho variado de escamas em suas porções cranial, torácica e caudal, e que os trabalhos citados não diferenciaram as escamas destas regiões, bem como não especificaram a localização das escamas utilizadas, nosso grupo optou por selecionar 10 escamas da região cranial de cada indivíduo ($n = 10$ animais), totalizando 100 escamas coletadas. Durante o processamento destas algumas foram perdidas, mas tal perda não foi significativa para influenciar nos resultados e na viabilidade do experimento.

Uma vez, que seriam realizadas duas técnicas de coloração com estas, o n final de escamas obtidas, foi dividido igualmente em dois grupos distintos: (1) coloração com alizarina red S e (2) coloração pela técnica fosfatase ácida resistente ao tartarato

(TRAP), a fim de se obter o n mínimo de escamas necessárias para a realização dos ensaios de acordo com a metodologia de coloração a ser utilizada (GRA.5.4.1) (TAB.5.4.1).



GRA.5.4.1 - Número de escamas de Zebrafish avaliadas pelas técnicas de alizarina red S e TRAP.

TAB.5.4.1 - Determinação do número mínimo de escamas de Zebrafish.

Ensaio	n de escamas	Grupos	
		CT	PN
Taxa de marcação % Cálcio	30	0,39 ± 0,01	0,36 ± 0,01 ^a
Reabsorção óssea % TRAP	35	0,15 ± 0,009	0,10 ± 0,003 ^a

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método One Way: teste de comparação múltipla de Tukey's, seguido de teste t pareado, média ± erro padrão.

Após o estabelecimento do n mínimo de escamas para cada tratamento, foram realizadas as aquisições de dados quanto ao grupo CT, PN, NM-Sr e R-Sr, para um tratamento de 7 dias.

Assim como os resultado obtidos por Vrieze (*et al.*, 2014), nossos ensaios também demonstraram que o grupo PN apresentou pela técnica de alizarina red S, redução das áreas mineralizadas, acompanhada da diminuição da intensidade de marcação no canal vermelho para cálcio, associada ao aumento de áreas de reabsorção óssea nas escamas de Zebrafish, evidenciados pela técnica de TRAP (TAB.5.4.2).

Já os grupos tratados com estrôncio, demonstraram resultados significativamente diferentes ao grupo PN e semelhantes ao grupo CT, indicando que ambos (NM-Sr e R-Sr), tiveram a dinâmica óssea influenciada. Estes apresentaram aumento das áreas mineralizadas e da intensidade de marcação no canal vermelho para cálcio, e diminuição das áreas de reabsorção óssea (TAB.5.4.2). Os dados qualitativos da avaliação das escamas são apresentados na FIG.5.4.1.

TAB.5.4.2 - Remodelação óssea das escamas de Zebrafish, em 7 dias de tratamento.

Ensaio	Grupos			
	CT	PN	NM-Sr	R-Sr
Reabsorção óssea % TRAP	0,45 ± 0,03 ^a	0,66 ± 0,01 ^b	0,44 ± 0,02 ^a	0,49 ± 0,02 ^a
Taxa de marcação % Cálcio	0,64 ± 0,06 ^a	0,39 ± 0,07 ^b	0,74 ± 0,04 ^a	0,61 ± 0,06 ^{a,b}
Intensidade de U.I. canal vermelho	3802 ± 405,7 ^a	2304 ± 424,3 ^b	4329 ± 244,5 ^a	3574 ± 364,7 ^{a,b}

^{a, b} nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método One Way: teste de comparação múltipla de Tukey's, seguido de teste t pareado, média ± erro padrão.

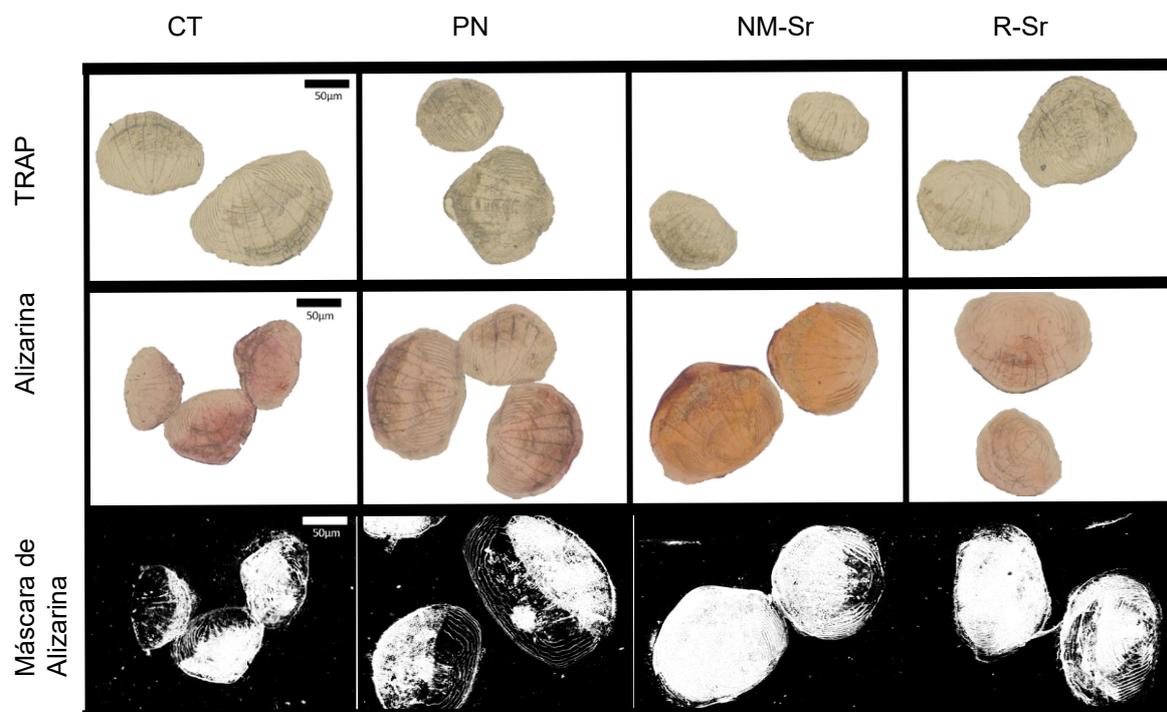


FIG.5.4.1 - Imagem microscópica demonstrando o aspecto e coloração das escamas de Zebrafish, de acordo com o grupo experimental e técnica histológica e citoquímica, em 7 dias de tratamento.

5.5 AVALIAÇÃO OSTEOGÊNICA CORPÓREA DE ZEBRAFISH

Os valores obtidos da partição corporal, evidenciam que existe um aumento da taxa de marcação por radiomarcador na região cranial dos grupos PN, NM-Sr e R-Sr, além de evidenciarem diminuições significativas na radiomarcação das frações corporal e visceral (TAB.5.5.1).

Entretanto na radiação corporal total (TAB.5.5.1), não fica evidente o efeito osteoporótico nos grupos PN, NM-Sr e R-Sr, embora seja observado que o complexo $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$ apresenta ampla biodistribuição, assim como descrito por McCracken (*et al.*, 2001).

Os resultados também sugerem que o grupo CT se encontrava saudável, visto ausência de alterações nessas porções (DE ABREU *et al.*, 2005).

TAB.5.5.1 - Taxa de marcação do complexo radiomarcador (CPM), na porção esquelética de Zebrafish, em 7 dias de tratamento.

Ensaio	Grupos			
	CT	PN	NM-Sr	R-Sr
CPM animal total (LOG)	1,64 ± 0,01	1,64 ± 0,03	1,61 ± 0,06	1,60 ± 0,04
CPM cabeça (LOG)	5,18 ± 0,22 ^a	5,85 ± 0,06 ^b	5,75 ± 0,08 ^b	5,54 ± 0,11 ^{a,b}
CPM corpo (LOG)	5,89 ± 0,08 ^{a,b}	6,00 ± 0,06 ^a	5,64 ± 0,07 ^{b,c}	5,58 ± 0,08 ^c
CPM vísceras (LOG)	5,54 ± 0,26 ^a	4,68 ± 0,27 ^b	4,31 ± 0,19 ^b	4,15 ± 0,15 ^b

^{a, b, c} nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método One Way: teste de comparação múltipla de Dunnett's, seguido de teste t pareado, média ± erro padrão

Uma vez que o ^{99m}Tc pode ser utilizado para o diagnóstico e acompanhamento da osteoporose (IPEN, 2015) devido a sua interação com a matriz óssea, é possível observar que sua associação com o MDP, marque as regiões ósseas onde o remodelamento está ocorrendo; e como a PR induz um quadro semelhante a osteoporose em Zebrafish é possível observar uma maior marcação nesses grupos.

A tabela demonstra uma maior taxa de marcação na porção cranial dos grupos tratados com PR e redução da taxa de marcação na porção corporal nos grupos NM-Sr e R-Sr em relação ao grupo PN. O aumento na taxa de marcação pode estar relacionado a propensão de microfraturas devido a osteoporose no crânio e nas vertebbras do Zebrafish, característica similar ao observado em camundongos e humanos (GUARNIERO & OLIVEIRA, 2004; CESAR *et al.*, 2013; SIQUEIRA, 2014).

Já a redução da taxa de marcação, pode ser um indicativo de eficiência do tratamento, visto que este tem como objetivo final aumentar a DMO. Apesar do grupo R-Sr apresentar-se diferente do grupo CT, deve-se lembrar que altas concentrações de estrôncio foram consideradas prejudiciais à saúde (EMA, 2014), logo o efeito observado no grupo NM-Sr, sugere que este, possa ser mais eficaz no quesito de uma remissão sem o comprometimento e/ou desenvolvimento indesejado de propriedades relacionadas ao metabolismo ósseo.

Um outro fator visualizado, é a redução da taxa de marcação nas vísceras dos grupos PN, NM-Sr e R-Sr em relação ao CT, uma vez, que o tempo de exposição ao complexo $^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$ foi de 1 hora para todos os grupos. Este achado levanta a hipótese de que, como o complexo não se liga facilmente a matriz óssea devido ao tecido ósseo estar maduro (IPEN, 2015) no grupo CT, o composto tende a ficar se movimentando pela corrente sanguínea até sua excreção, e com esta tem um tempo superior a 1 hora, a porção visceral por ser tão bem irrigada quanto as outras regiões do corpo, acaba apresentando uma maior captação do complexo no grupo CT, quando comparado aos demais grupos.

Além disso, comparando os dados obtidos neste trabalho aos obtidos por Doroudi (*et al.*, 2012), podemos inferir que a PR pode influenciar na osteogênese, mas que isso depende da dose e duração da administração, e para que o complexo radiomarcador atinja o local acometido através do fluxo sanguíneo no osso, e seja capaz de produzir uma imagem, é necessário que a DMO mínima devido a ligação do radiotraçador a superfície de hidroxiapatita, seja alcançada.

5.6 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE ZEBRAFISH

As concentrações de cálcio (Ca), estrôncio (Sr), fósforo (P), potássio (K), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se) obtidos, são apresentadas na tabela 5.6.1.

TAB.5.6.1 - Concentração de elementos químicos, presentes em amostras de sangue de Zebrafish, em 7 dias de tratamento.

Elemento Químico	Grupos			
	CT	PN	NM-Sr	R-Sr
Cálcio mg/L (LOG)	1,27 ± 0,01 ^a	1,11 ± 0,06 ^b	1,28 ± 0,03 ^a	1,27 ± 0,04 ^{a,b}
Estrôncio mg/L	0,09 ± 0,005 ^a	0,07 ± 0,009 ^b	0,10 ± 0,005 ^c	0,75 ± 0,06 ^d
Fósforo mg/L (LOG)	4,74 ± 0,01	4,79 ± 0,06	4,85 ± 0,01	4,83 ± 0,03
Potássio mg/L (LOG)	5,18 ± 0,01 ^{a,b}	5,05 ± 0,06 ^a	5,24 ± 0,01 ^b	5,18 ± 0,04 ^{a,b}
Manganês mg/L	0,07 ± 0,002 ^a	0,04 ± 0,005 ^b	0,08 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,002 ^{a,b}
Ferro mg/L (LOG)	4,07 ± 0,02 ^a	4,10 ± 0,08 ^a	4,30 ± 0,01 ^b	4,15 ± 0,04 ^{a,b}
Zinco mg/L	1,35 ± 0,19 ^a	1,84 ± 0,29 ^{a,b}	2,18 ± 0,09 ^b	1,71 ± 0,11 ^{a,b}
Cobre mg/L	0,28 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,008 ^{a,b}	0,19 ± 0,02 ^b
Selênio mg/L	0,006 ± 0,0003 ^a	0,01 ± 0,003 ^b	0,007 ± 0,001 ^a	0,01 ± 0,003 ^{a,b}

^{a, b, c, d} nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método One Way: teste de comparação múltipla de Dunnett's, seguido de teste t pareado, média ± erro padrão

Os dados obtidos pela concentração de cálcio (Ca), demonstram que os grupos tratados (NM-Sr e R-Sr), apresentaram valores iguais aos de indivíduos controle, enquanto os provenientes de PN apresentaram valores menores. Estes dados demonstram um quadro de hipocalcemia nos fluidos séricos, compatível com os dados obtidos pelas técnicas morfológicas e analíticas prévias.

Já os dados obtidos pela concentração de estrôncio (Sr), de forma similar ao esperado, apresentaram também concentração inferior no grupo PN em relação aos CT e demais tratamentos. De forma diferente, os grupos NM-Sr e R-Sr tiveram a concentração elevada, demonstrando haver uma distribuição digna de nota, significando a mobilização e retenção desse elemento, mantendo patamares internos em níveis diferentes. Devemos ressaltar, que a dose aplicada neste trabalho aparentemente elevada, mimetizou as utilizadas em mamíferos como humanos e roedores (MARIE *et al.*, 1993; SERVIER, 2015).

Em humanos a concentração normal de estrôncio sérico pode variar de região para região, sendo encontrados valores variando de $34,6 \pm 172$ ng/mL (FORRER *et al.*, 2001; SOMAROUTHU *et al.*, 2015). Visto que Ca^{2+} e Sr^{2+} , competem pelos mesmos receptores celulares, é normal o aparecimento de hipocalcemia em indivíduos que ingerem altas doses de estrôncio (ROCHA *et al.*, 2005), entretanto, no período de 1 semana não é possível observar quadro similar a hipocalcemia nos grupos NM-Sr e R-Sr. Mas atenção terapêutica deve ser dada a concentrações elevadas de estrôncio sistêmico, que podem causar o aparecimento de doenças ósseas, inibir vias metabólicas como a da síntese de 1,25 di-hidroxitamina D que é essencial no processo de remodelagem (ROCHA *et al.*, 2005). Isso ressalta os dados obtidos no presente estudo, pois pode sugerir que a baixa dose terapêutica, seria adjuvante no processo de mineralização óssea.

Em relação ao fósforo (P), não é possível observar diferença entre os grupos. O fósforo é um elemento abundante e muito difundido em sua distribuição. É o principal ânion intracelular em mamíferos. O fósforo corporal total em um homem de 70 kg é cerca de 700 a 800 mg, 85% dos quais estão no esqueleto na forma de hidroxiapatita; os 15% restantes estão em tecidos moles. Quase todo o fósforo encontrado no espaço do fluido extracelular, está na forma de fosfato inorgânico. O fosfato inorgânico sérico, reflete apenas uma porcentagem muito pequena do fósforo corporal total; no entanto,

é facilmente mensurável, sendo viável para elucidar sobre o status, dos estoques de fósforo do corpo (WALKER, HALL & HURST, 1990). Os dados obtidos demonstram que o equilíbrio homeostático não sofreu influência significativa entre os grupos para 7 dias de tratamento.

O potássio (K) por sua vez, apresentou pouca diferença entre os grupos testados. As concentrações deste elemento variaram apenas entre os tratamentos PN e NM-Sr. O potássio é o cátion mais abundante no fluido intracelular (apenas 2% do potássio corporal total, pode ser encontrado no líquido extracelular), e desempenha um papel vital na manutenção das funções celulares normais. Assim, a homeostase do potássio através da membrana celular, é crítica, visto que uma inclinação neste equilíbrio, pode resultar em diferentes doenças, podendo algumas serem fatais. Tanto o estresse oxidativo (OS) quanto o desequilíbrio de potássio, podem causar problemas de saúde (UDENSI & TCHOUNWOU, 2017; LAUR *et al.*, 2020). Em uma pessoa normal e saudável, o potássio plasmático é mantido dentro de uma faixa estreita de 3,5 – 5,0 mEq/L (LEE-LEWANDROWSKI, BURNETT & LEWANDROWSKI, 2002).

O manganês (Mn), também apresentou variação entre os grupos experimentais. Menores valores séricos presentes no grupo PN, podem sugerir a exemplo do encontrado para o potássio concentrações metabólicas subótimas nesse grupo.

O manganês (Mn) é um elemento essencial, que está envolvido na síntese e ativação de muitas enzimas, e na regulação do metabolismo da glicose e lipídios em humanos. Além disso, é um dos componentes necessários para a superóxido dismutase de Mn (MnSOD), que é principalmente responsável pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), no estresse oxidativo mitocondrial. Tanto a deficiência de manganês quanto a intoxicação, estão associadas a efeitos adversos metabólicos e neuropsiquiátricos (LI & YANG, 2018). Ainda que seu aumento possa levar à toxicidade e a quadros fenotípicos semelhantes ao Parkinson, sua redução prejudica o crescimento e função reprodutiva, gerando anormalidades esqueléticas e alterações metabólicas de lipídios e carboidratos (ZHAO, XIA & WANG, 2014; BAKTHAVATSALAM *et al.*, 2014; LAUR *et al.*, 2020).

Os dados referentes ao ferro (Fe), apresentam elevação no tratamento NM-Sr, não diferindo do tratamento R-Sr. O Ferro é vital para o desenvolvimento normal - sua

aquisição pelos glóbulos vermelhos (RBCs), permite a produção de hemoglobina (Hb) e o fornecimento de oxigênio aos tecidos em desenvolvimento. As células de vertebrados, obtêm ferro principalmente por meio de receptores de transferrina (Tf), que se ligam ao transportador de ferro. Intracelularmente são armazenados na proteína ferritina ou seu derivado hemossiderina. Em humanos, sua elevação pode causar problemas hepáticos, cardíacos (LAUR *et al.*, 2020). Por esse motivo, consideramos que análises adicionais devam ser efetuadas, a fim de determinar se esse feito deriva da presença do Sr.

O zinco (Zn) por sua vez, apresentaram aumento sérico nos tratamentos PN, NM-Sr e R-Sr, (todos submetidos ao pré-tratamento com prednisona) em relação ao CT.

O zinco é um mineral essencial, necessário para o crescimento normal do esqueleto e a homeostase óssea. Além disso, o zinco parece ser capaz de promover a regeneração óssea, mas, as vias celulares e moleculares através das quais o zinco promove o crescimento ósseo, a homeostase e a regeneração são pouco conhecidas. O zinco pode afetar positivamente as funções dos condrócitos e dos osteoblastos, enquanto inibe a atividade dos osteoclastos, o que é consistente com um papel benéfico do zinco na homeostase e regeneração óssea (ROOHANI *et al.*, 2013; O'CONNOR *et al.*, 2020). Além disso, apresenta funções relacionadas a cicatrização e regeneração celular, sendo que reduções em suas concentrações podem causar disfunções imunológicas e neurológicas (STRACHAN, 2010). Estressores fisiológicos, incluindo trauma cirúrgico, choque hemorrágico, lesão térmica e fratura óssea, podem causar reduções temporárias nos níveis séricos de zinco (PEKAREK & BEISEL, 1969; MYERS *et al.*, 1984; BOOSALIS *et al.*, 1988; ; KUMAR, GILL & RATTAN, 1991; GAETKE *et al.*, 1997), e curiosamente, enquanto os níveis séricos de zinco diminuir após uma lesão traumática, os níveis de zinco aumentam no local da lesão (CALHOUN, CAMPBELL & SMITH, 1970)

Portanto o aparente aumento em organismos tratados pode indicar que o sistema sanguíneo também se encontra em processo de estabilização da sua homeostase.

Após o ferro e o zinco, o cobre (Cu) é o terceiro oligoelemento mais abundante nos organismos, sendo suas concentrações semelhantes às encontradas em amostras de

solo (SANTOS, 2006). Além disso, estes oligoelementos apresentam relação com funções neuronais, sendo de extrema importância para o bom desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (QIAN *et al.*, 2019). Em adição, o cobre é o cofator de diversos sistemas enzimáticos com importante papel na absorção e no metabolismo do ferro (LAUR *et al.*, 2020), assim como atua na cicatrização de feridas e tem funções imunológicas. Sua deficiência pode estar relacionada a osteopenia e a anormalidades articulares, assim como despigmentação da pele (STRACHAN, 2010). Ainda, os valores encontrados por Forrer, (2001), apresentam-se mais elevados em humanos do que em Zebrafish.

O selênio (Se) demonstra um aumento no grupo PN. Foi relatado que a inadequação de selênio, pode retardar o crescimento e alterar o metabolismo ósseo (MORENO-REYES *et al.*, 2001; CAO, GREGOIRE & ZENG, 2012), e que a concentração de selênio no sangue, está inversamente relacionada à taxa de renovação óssea e positivamente correlacionada com a prevalência de baixa densidade mineral óssea (DMO) em humanos (HOEG *et al.*, 2012). A baixa ingestão de selênio, é associada ao aumento do risco de doenças ósseas (ZHANG 2006; JOHNSON, FORDYCE & RAYMAN, 2010; CAO, GREGOIRE & ZENG, 2012; MANOLAGAS, 2010).

Os resultados dos estudos mecanísticos sugeriram um mecanismo subjacente, ou seja, o do selênio desempenhando um papel essencial na defesa antioxidante, apoiando a vigilância imunológica, a proliferação e diferenciação celular (SAITO 2003; ZHANG 2006; CAO, GREGOIRE & ZENG, 2012). Entretanto, ainda que concentrações superiores tenham sido encontradas em PN, estes valores são inferiores aos encontrados em soro humano por Forrer, (GAUTSCHI & LUTZ, 2001).

De acordo com ensaios realizados por LEE (et al., 2019) reduções nas concentrações de selênio, zinco e cobre em humanos podem estar relacionadas a problemas imunológicos que podem levar a óbito, como por exemplo seps e respostas inflamatórias.

As análises de correlação de Person, obtidas das regressões entre pares de cada grupo experimental, demonstrou que os animais do grupo PN apresentaram 34 correlações significativas, diferindo do número de correlações observadas em CT (7),

NM-Sr (2) e R-Sr (13) (TAB.5.6.2, TAB.5.6.3, TAB.5.6.4 e TAB.5.6.5), sugerindo que a aplicação da prednisona, atua sistematicamente na perda da homeostase de diversos elementos químicos, sendo passível sugerir quadro de remissão, quando os valores se assemelham aos observados nos animais do grupo CT.

TAB.5.6.2 - Correlação elementar dentro do grupo CT, em 7 dias de tratamento.

Elemento químico	Ca	Sr	P	K	Mn	Fe	Zn	Cu	Se
Ca									
Sr	0,85 ^a								
P	0,32	-0,11							
K	0,15	-0,23	0,75						
Mn	0,84 ^a	0,51	0,77	0,54					
Fe	0,22	-0,24	0,88 ^a	0,96 ^a	0,65				
Zn	0,27	0,23	0,45	0,67	0,47	0,53			
Cu	0,60	0,61	-0,01	0,38	0,41	0,22	0,64		
Se	0,12	-0,14	0,81	0,86 ^a	0,55	0,83 ^a	0,83 ^a	0,26	

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método de teste de correlação de Pearson.

TAB.5.6.3 - Correlação elementar dentro do grupo PN, em 7 dias de tratamento.

Elemento químico	Ca	Sr	P	K	Mn	Fe	Zn	Cu	Se
Ca									
Sr	0,96 ^a								
P	0,91 ^a	0,84 ^a							
K	0,98 ^a	0,93 ^a	0,95 ^a						
Mn	0,94 ^a	0,98 ^a	0,84 ^a	0,92 ^a					
Fe	0,95 ^a	0,98 ^a	0,89 ^a	0,92 ^a	0,97 ^a				
Zn	0,84 ^a	0,77	0,98 ^a	0,90 ^a	0,78	0,84 ^a			
Cu	0,93 ^a	0,87 ^a	0,98 ^a	0,98 ^a	0,85 ^a	0,87 ^a	0,94 ^a		
Se	0,92 ^a	0,92 ^a	0,92 ^a	0,91 ^a	0,90 ^a	0,96 ^a	0,89 ^a	0,91 ^a	

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método de teste de correlação de Pearson.

TAB.5.6.4 - Correlação elementar dentro do grupo NM-Sr, em 7 dias de tratamento.

Elemento químico	Ca	Sr	P	K	Mn	Fe	Zn	Cu	Se
Ca									
Sr	0,64								
P	0,63	0,24							

K	0,29	0,10	0,86 ^a					
Mn	0,35	0,23	0,11	0,18				
Fe	0,41	0,16	-0,11	-0,37	0,69			
Zn	-0,26	-0,43	0,22	0,15	-0,04	0,14		
Cu	-0,37	-0,49	0,26	0,25	-0,24	-0,11	0,96 ^a	
Se	0,14	-0,26	-0,10	-0,46	0,14	0,75	0,55	0,37

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método de teste de correlação de Pearson.

TAB.5.6.5 - Correlação elementar dentro do grupo R-Sr, em 7 dias de tratamento.

Elemento químico	Ca	Sr	P	K	Mn	Fe	Zn	Cu	Se
Ca									
Sr	0,82								
P	0,99 ^a	0,81							
K	0,98 ^a	0,85	0,99 ^a						
Mn	0,52	0,57	0,62	0,67					
Fe	0,65	0,68	0,74	0,79	0,97 ^a				
Zn	0,62	0,59	0,71	0,74	0,94 ^a	0,98 ^a			
Cu	0,85	0,64	0,91 ^a	0,91 ^a	0,82	0,89 ^a	0,90 ^a		
Se	0,59	0,65	0,68	0,72	0,94 ^a	0,98 ^a	0,98 ^a	0,85	

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método de teste de correlação de Pearson.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DE ESTRÔNCIO EM AMOSTRAS DE ÁGUA EM 24 HORAS

A concentração de estrôncio pode variar dependendo do ambiente, uma vez que ele se distribui de forma diferente sobre a crosta terrestre. Nos oceanos por exemplo, sua concentração média é de 7,7mg/L (FAURE, 1986), enquanto em águas subterrâneas e pluviais pode variar de 6 a 874 μ g/L (BANNER, MUSGROVE & CAPO, 1994; BANNER, 2004). Desta forma, faremos uma comparação baseando-se nos valores obtidos no ICB-UFMG.

A TAB.5.7.1 demonstra que não há diferença significativa nas concentrações de estrôncio após 1 hora nos grupos controle experimental (CE), controle tratado com NPM-Sr (CT^{+NPM-Sr}) e osteoporótico tratado com NPM-Sr (NM-Sr). Entretanto com o passar do tempo a concentração deste elemento começa a se elevar nos grupos

tratados, demonstrando que em 3 horas ocorre um aumento da excreção nos grupos CT^{+NPM-Sr} e NM-Sr. Sendo está mais elevada no grupo CT^{+NPM-Sr}. Provavelmente isso, se deve ao fato da mobilização dos elementos. Já em 24 horas parece haver uma estabilização na excreção devido ao valor ser similar ao observado no grupo em T_{3horas}.

TAB.5.7.1 - Concentração de estrôncio em amostras de água, em um período de 24 horas.

Ensaio	Grupos		
	CE	CT ^{+NPM-Sr}	PN
Concentração µg/L de ⁸⁸ Sr em T _{1hora}	41,10 ± 0,0	40,35 ± 3,01	46,38 ± 2,55
Concentração µg/L de ⁸⁸ Sr em T _{3horas}	41,10 ± 0,0	62,33 ± 1,69 ^a	54,65 ± 6,48 ^a
Concentração µg/L de ⁸⁸ Sr em T _{24horas}	41,10 ± 0,0	53,97 ± 2,66 ^a	59,34 ± 0,83 ^a

^a nível de significância $p < 0,05$ conforme determinado por método One Way: teste de comparação múltipla de Dunnett's, seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni's, média ± erro padrão

Estes dados levantam a possibilidade de ensaios para avaliação da taxa de depuração e residência de nanomaterial, uma vez que, não houve modificação entre as taxas excretadas entre os indivíduos normais e osteoporóticos, tratados com o nanomaterial entre T_{3horas} e T_{24horas}.

CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO GERAL

O NPM-Sr se mostrou biomimética compatível com a remissão do quadro com fenótipo semelhante a osteoporose no Zebrafish. Além disso, sua comparação com a forma injetada de Sr, apresenta-se como potencial formulação, e apresentando vantagens como redução do princípio ativo em cerca de 75 vezes com manutenção de efeito terapêutico e mínimo efeito sobre fluidos corporais, para um período de 7 dias.

Desta forma, os dados aqui apresentados, são fundamentais para o estabelecimento de novas estratégias de tratamento partindo de configurações biológicas de fácil manuseio, obtenção e com reatividade que permitam mimetizar seus potenciais efeitos em vertebrados. De forma complementar, estabelecemos a correlação de oligoelementos traços a novas estratégias terapêuticas, algo de extrema necessidade.

Esses dados sugerem, que o NPM-Sr apresenta um potencial terapêutico para o tratamento de quadro fenotípico semelhante a osteoporose induzida pelo uso de glicocorticoides em modelo experimental de Zebrafish, e que sua ação, pode ser identificada neste modelo, a partir da primeira aplicação em uma dose semanal e de baixa concentração.

O uso do Zebrafish para análises farmacológicas tende a torná-las mais simples e de fácil repetição, visto o fácil manejo dos animais (SPENCE *et al.*, 2006). A utilização da prednisona em modelo experimental Zebrafish, confirmou que esta pode alterar diretamente não apenas as características externas dos peixes (escamas), mas também, reflete no quadro osteoporótico em níveis metabólicos e microestruturais, passíveis de serem analisadas de forma reprodutível e viável, possibilitando deste modo, a abertura para avaliação de novas abordagens terapêuticas. Ainda que de forma similar a outros modelos, não se deve negligenciar potenciais efeitos secundários associados como: o estresse, e processos inflamatórios, eventualmente citados pelo uso de prednisona, ainda que, nenhuma vez tenham sido avaliados em nosso estudo.

Os resultados obtidos, permitem-nos sugerir que as metodologias escolhidas para a realização dos ensaios em Zebrafish adultos, são viáveis para testes iniciais de outras drogas ou formulações.

Embora o imageamento não tenha possibilitado neste modelo a visualização de possíveis alterações ósseas, neste estudo, a utilização de radiomarcadores ($^{99m}\text{Tc}/\text{MDP}$) são um marco de novas estratégias de estudos para esse modelo experimental, já que auxiliam na visualização e diagnóstico, referentes ao recrutamento osteoblástico, e conseqüentemente, neoformação óssea, assim como a abordagem de aplicação celomática, como métodos inéditos na literatura (DE BARROS *et al.*, 2012).

Os resultados aqui obtidos, demonstram que as determinações de elementos químicos por técnica analítica, contribui eficientemente na determinação dos níveis séricos nesse modelo, bem como em sua potencial via de excreção. Também demonstram que há uma relação entre os elementos químicos e o bem-estar animal, visto que muitos deles se relacionam com fatores patológicos, como por exemplo, a perda de massa óssea. Esses dados ainda trazem a luz, uma perspectiva de que a resposta inflamatória desenvolvida nos grupos tratados, tende a alterar as concentrações dos elementos para valores inferiores ou superiores aos observados no grupo CT e inferiores ao visualizado no grupo PN, sendo este, um indicio de que os tratamentos de alguma forma estão impactando na biodistribuição dos elementos, e conseqüentemente, atuando sobre o metabolismo ósseo dos animais, visto os resultados obtidos nos demais ensaios apresentados.

Com isso, sugerimos que o Zebrafish seja considerado como um modelo viável para estudo translacional de novas terapias em modelo de osteoporose induzida por prednisona, sendo aplicáveis com facilidade tanto técnicas de rotina citológica, histológica e morfométrica como técnicas analíticas como a de imageamento não invasivo com a utilização de radionuclídeos, fluorescência de raio-x e tomografia. Assim como demonstramos que o NPM-Sr sintetizado por nosso grupo, tem uma possível ação terapêutica no quadro desenvolvido em Zebrafish, podendo ser considerado como uma abordagem no tratamento da osteoporose induzida pelo uso de glicocorticoides como a prednisona.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÃO

A metodologia de injeção intracelomática e o tratamento utilizando nanomaterial fosfatado contendo estrôncio, permitiram visualizar a remissão do quadro semelhante a osteoporose.

As metodologias aplicadas permitiram qualitativamente identificar as principais características relacionadas ao fenótipo osteoporótico.

A utilização de estrôncio em baixas dosagens dentro de estruturas nanométricas, permitiram a visualizar remissão de quadro semelhante a osteoporose.

As concentrações de estrôncio excretadas demonstram que há mobilização interna deste elemento em direção ao meio externo de forma similar em animais saudáveis e osteoporóticos tratados com NPM-Sr.

O modelo de Zebrafish permite a visualização de quadro semelhante a osteoporose, tanto em ensaios por escama quanto por radiomarcção do corpo e análise elementar em amostras de sangue.

O comportamento elementar e morfológico utilizando Zebrafish para quadro semelhante a osteoporose demonstrou similaridade com humano, demonstrando que este é um modelo translacional viável para análise da osteoporose.

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS

Para melhor compreendermos os resultados aqui obtidos e estabelecermos uma melhor forma de inserção da nanoestrutura desenvolvida na sociedade, citamos abaixo algumas das avaliações que pretendemos realizar em estudos futuros:

- Análise de FET para cardiotoxicidade e genotoxicidade;
- Análise de MicroRNAs relacionados a osteoporose e o emprego destes em nanopartículas;
- Análise da expressão gênica;
- Avaliação dos efeitos Adversos – cardiotoxicidade, alterações hormonais, alterações neurológicas;
- Avaliação das possíveis influências físicas do NPM-Sr.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANIAN, Patrick & MOHAN, Subburaman. The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. **Bone Research**, v. 6, n. 19, 2018.

AIMAITI, Abudousaimi; MAIMAITIYIMING, Asihaerjiang; BOYONG, Xu; KAISAIER, Aji; CAO, Li & CUI, Lei. Low-dose strontium stimulates osteogenesis but high-dose doses cause apoptosis in human adipose-derived stem cells via regulation of the ERK1/2 signaling pathway. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 282, 2017.

ALGHAMDI, Hamdan S; BOSCO, Ruggero; BOTH, Sanne K; LAFISCO, Michele; LEEUWENBURGH, Sander C.G; JANSEN, John A. & VAN DEN BEUCKEN, Jeroen J.J.P. Synergistic effects of bisphosphonate and calcium phosphate nanoparticles on peri-implant bone responses in osteoporotic rats. **Biomaterials**, v. 35, n. 21, p. 5482 - 5490, 2014.

ALVARENGA, Betânia M; MELO, Maria N; FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia P; GOMES, Juliana M. M; BORBA, José B.; SPEZIALIE, Nivaldo L. & CORRÊA JÚNIOR, José D. Nanoparticle phosphate-based composites as vehicles for antimony delivery to macrophages: possible use in leishmaniasis. **Journal of Materials Chemistry B**, v.3, p. 9250 - 9259, 2015.

ALVES, Kleber G.B. Síntese e caracterização de materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores e compósitos com óxidos metálicos. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco**. CCEN. Ciências de Materiais, 2010.

ANDREU, Nuria; ELKINGTON, Paul T. & WILES, Siouxsie. Molecular Imaging in TB: From the Bench to the Clinic. (Chapter 15) – Understanding Tuberculosis. Global Experiences and Innovative. Approaches to the Diagnosis. Edited by Pere-Joan Cardona. **IntechOpen**, 2012.

ANSELMO, Aaron C. & MITRAGOTRI, Samir. Nanoparticles in the clinic. **Bioengineering & Translational Medicine**. v. 1, n. 1, 2016.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas: Detalhe do produto – PROTOS. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351040974200590/>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

AZIZIYEH, Rima; AMIN, Mo; HABIB, Mohdhar; PERLAZA, Javier G.; SZAFRANSKI, Kirk; MCTAVISH, Rebecca K; DISHER, Tim; LÜDKE, Ana & CAMERON, Chris. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. **Journal of Medical Economics**, v. 22, n. 7, p. 638 - 644, 2019.

BAKTHAVATSALAM, Subha; SHARMA, Shreya D.; SONAWANE, Mahendra; THIRUMALAI, Vatsala & DATTA, Ankona. A zebrafish model of manganese reveals reversible and treatment symptoms that are independent of neurotoxicity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1239 – 1251, 2014.

BANDEIRA, Francisco & CARVALHO, Eduardo F. de. Prevalência de osteoporose e fraturas vertebrais em mulheres pós-menopausa atendidas em serviços de referência. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 1, p. 86 - 98, 2007.

BANNER, Jay L; MUSGROVE, MaryLynn & CAPO, R.C. Tracing ground-water evolution in a limestone aquifer using Sr isotopes: Effects of multiple sources of dissolved ions and mineral-solution reactions. **Geology**, v. 22, n. 8, p. 687 - 690, 1994.

BANNER, Jay L. Radiogenic isotopes: systematics and applications to earth surface processes and chemical stratigraphy. **Earth-Science Reviews**, v. 65, p. 141 - 191, 2004.

BILO, Fabjola, MOSCOSO, Sdenka; BORGES, Laura; DELBARBA, Maria V; ZACCO, Annalisa; BOSIO, Alberto; FEDERICI, Stefania; GUARIENTI, Michela; PRESTA, Marco; BONTEMPI, Elza & DEPERO, Laura E. Total reflection X-ray fluorescence spectroscopy to study Pb and Zn accumulation in zebrafish embryos. **X-Ray Spectrometry**, v. 44, n. 3, p. 124 - 128, 2015.

BLAKE, Glen M; PARK-HOLOHAN, So-Jin; COOK, Gary J.R & FOGELMAN, Ignac. Quantitative studies of bone with the use of ¹⁸F-fluoride and ^{99m}Tc-methylene diphosphonate. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 31, n. 1, p. 28 - 49, 2001.

BOMBARDELI, Robie A; MEURER, Fábio & SYPERRECK, Mirna A. Metabolismo proteico em peixes. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 1, p. 69 - 79, 2003.

BOOSALIS, M.G.; SOLEM, L.D.; MCCALL, J.T.; AHRENHOLZ, D.H.; MCCLAIN, C.J. Serum zinc response in thermal injury. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 69 - 76, 1988.

BORELLA, Ana Paula de O; SOUZA, Carolina S. de. & KOESTER, Letícia S. OSTEOPOROSE: TRATAMENTOS DISPONÍVEIS NA ATUALIDADE. **Revista Ciências da Saúde**, Florianópolis, v. 25, n. 2, p. 56 - 72, 2006.

BORGES, Larissa A. & NEGREIROS, Edson. **Uso de corticoides e osteoporose: uma revisão**. Disponível em: < <https://silo.tips/download/uso-de-corticoides-e-osteoporose-uma-revisao> >. Acesso em: 25 Jul. 2017.

BORRELLI, Joseph. The Relationship of Peak Bone Mass, Aging, and Bone Loss to Osteoporosis and Fragility Fractures. In: Borrelli Jr. J., Anglen J. (eds) Arthroplasty for the Treatment of Fractures in the Older Patient. **Springer, Cham**, v.1, 2018.

BRASIL. M80-M85 Transtornos da densidade e da estrutura óssea. Disponível em: http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/WebHelp/m80_m85.htm. Acesso em: 14 fev. 2019.

BRENNAN, T.C.; RYBCHYN, M.A.; GREEN, W.; ATWA, S.; CONIGRAVE, A.D. & MASON, R.S. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1291 - 1300, 2009.

CAI, Yurong & TANG, Ruikang. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 32, p. 3775 - 3787, 2008.

CALHOUN, N.R.; CAMPBELL, S.; SMITH, J.C. Accumulation of Labeled Zinc, Strontium, and Calcium in Bone Injuries. **Journal of Dental Research**, v. 49, n. 5, p. 1083 - 1085, 1970.

CAMPOS, Lúcia M.A.; LIPHAUS, Bernadete L.; SILVA, Clóvis A.A. & PEREIRA, Rosa M.R. Osteoporosis in childhood and adolescence. **Jornal de Pediatria**, v.79, n. 6, p. 481 - 488, 2003.

CANER, Biray; KITAPÇL, Mehmet; UNLÜ, Mustafa; ERBENGLI, Günaydin; ÇALIKOGLU, Tamer; GÖGÜS, Talat & BEKDIK, Coşkun. Technetium -99m-MIBI Uptake in Benign and Malignant Bone Lesions: A Comparative Study with Technetium-99m-MDP. **Journal Nuclear Medicine**, v. 33, p. 319 - 324, 1992.

CAO, Jay J; GREGOIRE, Brian R; ZENG, Huawei. Selenium deficiency decreases antioxidative capacity and is detrimental to bone microarchitecture in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 8, p. 1526 - 1531, 2012.

CAPELETTI, Larissa B; DE OLIVEIRA, Jessica F.A; LOIOLA, Livia M.D; GALDINO, Flávia E; SANTOS, Denys E. da S; SOARES, Thereza A; FREITAS, Raul de O. & CARDOSO, Mateus B. Gram-negative bacteria targeting mediated by Carbohydrate-Carbohydrate interactions induced by Surface-modified nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 29, n. 48, 2019.

CESAR, Reinaldo; ROLLO, J.M.D.A; BOFFA, R.S; FACHINE, L.T; BELLANI, C.F. & LEIVAS, T.P. **Avaliação de osteopenia e osteoporose por microtomografia 3D** (2013). Disponível em:< <http://www.biolab.eletrica.ufu.br/simposios/viseb/ArtigoSEB-OsteopeniaOsteoporose.pdf>>. Acesso em: 8 Dez. 2020.

CHEN, Jian s. & SAMBROOK, Philip N. Antiresorptive therapies for osteoporosis: a clinical overview. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 2, p. 81 - 91, 2011.

CHEN, YinG; KAWAZOE, Naoki & CHEN, Guoping. Preparation of dexamethasone-loaded biphasic calcium phosphate nanoparticles/collagen porous composite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 67, p. 341 - 353, 2018.

CHENG, Cheng; WENTWORTH, Kelly & SHOBACK, Dolores M. New Frontiers in Osteoporosis Therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 71, n. 1, p. 277 - 288, 2020.

CHIU, Wei-Yih; YANG, Wei-Shiung; CHIEN, Jung-Yien; LEE, Jang-Jaer & TSAI, Keh-Sung. The influence of alendronate and tooth extraction on the incidence of osteonecrosis of the jaw among osteoporotic subjects. **Plos One**, v. 13, n. 4, 2018.

CHU, Weijing; HUANG, Yanjuan; YANG, Chanzhen; LIAO, Yunhui; ZHANG, Xuefei; YAN, Mina; CUI, Shengmiao & ZHAO, Chunshun. Calcium phosphate nanoparticles functionalized with alendronate-conjugated polyethylene glycol (PEG) for the treatment of bone metastasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 352 - 363, 2017.

COLE, Lisa E; VARGO-GOGOLA, Tracy & ROEDER, Ryan K. Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 12 - 27, 2016.

CONCEA. Resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf>. Acesso em: 01 set. 2018.

CONNELLY, Dawn. Osteoporosis: moving beyond bisphosphonates. **The Pharmaceutical Journal**, v. 297, n. 7895, 2016.

COOPER, C; CAMPION, G & MELTON, L. J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. **Osteoporosis International**, v. 2, p. 285 - 9, 1992.

COSMAN, F; DE BEUR, S.J; LEBOFF, M.S; LEWIECKI, E.M; TANNER, B; RANDALL, S. & LINDSAY, R. National Osteoporosis Foundation. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p 2359 - 2381, 2014.

COSMAN, Felicia; NIEVES, Jeri W. & DEMPSTER, David W. Treatment Sequence Matters: Anabolic and Antiresorptive Therapy for Osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 2, p. 198 - 202, 2017.

COSMAN, Felicia. The evolving role of anabolic therapy in the treatment of osteoporosis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 31, n. 4, p. 376 - 380, 2019.

COSTA, Juliana M. Níveis de fósforo em dietas para Zebrafish Danio rerio. Botucatu: [s.n.], 2015 xii, 77. **Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015.

DA MATA, Priscila R; MARTINS, Paulo A; BRITO, Leonardo da G; RAMOS, Monique M.P. & DOS SANTOS JUNIOR, Manoelito C. Tratamento farmacológico para a osteoporose. **Geriatrics & Gerontology**, v.6, n. 4, 2012.

DAMMSKI, Ana P; MÜLLER, Bruno R; GAYA, Carolina & REGONATO, Daiane. Zebrafish: Manual de Criação em Biotério. 1ªed. **Universidade Federal do Paraná**. 2011.

DANIELS, Kevin. D., VANDERVORT, Darcy, WU, Shumin, LEUSCH, Frederic D. L., VAN DE MERWE, Jason P., JIA, Ai, & SNYDER, Shane A. Downstream trends of in vitro bioassay responses in a wastewater effluent-dominated river. **Chemosphere**, v. 212, p. 182 - 192, 2018.

DE ABREU, Benedita A.L; CHAVES, Gerardo A.; Junior, José S.; DE ABREU, Evandro L; FONTES, Emanuel A de C; ABREU, Everardo L. & BONA, José W. CINTILOGRAFIA ÓSSEA NO CÂNCER DE PRÓSTATA. Artigo de revisão. **Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem**, v. 38, n. 5, p. 365 - 369, 2005.

DE BARROS, André L. B.; TSOURKAS, Andrew; SABOURY, Babak; CARDOSO, Valbert N. & ALAVI, Abass. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. **EJNMMI Research**, v. 2, n. 39, 2012.

DE MORAES, Sylvio L C; AFONSO, Alexandre M de P; DOS SANTOS, Roberto G; MATTOS, Ricardo P; OLIVEIRA, Maiolono T. F; ZANETTA-BARBOSA, Darceny &

DUARTE, Bruno G. Riscos e complicações para os ossos da face decorrentes do uso de bifosfonatos. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 70, n. 2, 2013.

DE OLIVEIRA, Juliana H. A; BRACCO, Oswaldo L; KAYATH, Marcia & GUARNIERO, Roberto. Teriparatida (PTH[1-34]rh): Uma nova perspectiva no tratamento da osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11 n. 3, 2003.

DOROUDI, Alireza; SAADATI, Seyyed M.; AHMADI, Faramarz; KHODAYAR, Javad; REZAEI, Saeed & KAYDAN, Hossein H. The effect of prednisolone on the sensitivity of Technetium 99m-methylene diphosphonate (^{99m}Tc-MDP) scintigraphy to detect simulated closed fracture in the rat tibia. **Iranian Journal of Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 32 - 38, 2012.

EASTELL, Richard; ROSEN, Clifford J; BLACK, Dennis M; CHEUNG, Angela M; MURAD, M H. & SHOBACK, Dolores. Pharmacological Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 5, p. 1595 - 1622, 2019.

EIKEN, P. A; PRIETO-ALHAMBRA, D; EASTELL, R & ABRAHAMSEN, B. Surgically treated osteonecrosis and osteomyelitis of the jaw and oral cavity in patients highly adherent to alendronate treatment: a nationwide user-only cohort study including over 60,000 alendronate users. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 10, p. 2921 - 2928, 2017.

EMA – European Medicines Agency (Science Medicines Health) – OSSEOR: Ranelato de estrôncio. EMA/139812/2014. EMEA/H/C/000561. Disponível em: < https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/osseor-epar-summary-public_pt.pdf >. Acesso em: 08 Jan. 2021.

EMKEY, Gregory R. & EPSTEIN, Sol. Secondary osteoporosis: Pathophysiology & diagnosis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 6, p. 911 - 935, 2014.

FAIÇAL, S. & UEHARA, M.H. Efeitos sistêmicos e síndrome de retirada em tomadores crônicos de corticosteroides. Artigo de revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 1, 1998.

FAURE, G. Principles of Isotope Geology. **Geological Magazine**, v. 124, n. 6, p. 594 - 595, 1987.

FDA – U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. GUIDANCE DOCUMENT: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology Guidance for Industry. JUNE 2014. Disponível em: < <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology> >. Acesso em: 25 Dez. 2019.

FILHO, Edmilson D. da; BRAZ, Airton S. & CHAGAS, Rennalle C. de O. Avaliação dos parâmetros físico-químicos de águas minerais comercializadas no município de Campina Grande – PB. **Revista Principia: Divulgação científica e tecnológica do IFPB**, n. 30, 2016.

FORRER, R., GAUTSCHI, K., & LUTZ, H. Simultaneous Measurement of the Trace Elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in Human Serum and Their Reference Ranges by ICP-MS. **Biological Trace Element Research**, v. 80, n. 1, p. 77 - 93, 2001.

FURUYA, Masayuki; KIKUTA, Junichi; FUJIMORI, Sayumi; SENO, Shigeto; MAEDA, Hiroki; SHIRAZAKI, Mai; UENAKA, Maki; MIZUNO, Hiroki; IWAMOTO, Yoriko; MORIMOTO, Akito; HASHIMOTO, Kunihiko; ITO, Takeshi; ISOGAI, Yukihiko; KASHII, Masafumi; KAITO, Takashi; OHBA, Shinsuke; CHUNG, Ung-il; LICHTLER, Alexander C.; KIKUCHI, Kazuya; MATSUDA, Hideo; YOSHIKAWA, Hideki & ISHII, Masaru. Direct cell–cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

GAETKE, L.M.; MCCLAIN, C.J.; TALWALKAR, R.T.; SHEDLOFSKY, S.I. Effects of endotoxin on zinc metabolism in human volunteers. **The American Journal of Physiology**, v. 272, p. 952 - 956, 1997.

GALI, Julio C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 53 - 62, 2001.

GARTNER, Leslie P. & HIATT, James L. Tratado de Histologia em cores. 3ed., **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2007.

GEURTZEN, Karina & KNOPF, Franziska. Adult Zebrafish Injury Models to Study the Effects of Prednisone in Regenerating Bone Tissue. **Journal of Visualized Experiments**, v. 140, 2018.

GOLZIO, Christelle; WILLER, Jason; TALKOWSKI, Michael E; OH, Edwin C; TANIGUCHI, Yu; JACQUEMONT, Sébastien; REYMOND, Alexandre; SUN, Mei; SAWA, Akira; GUSELLA, James F; KAMIYA, Atsishi; BECKMANN, Jacques S. & KATSANIS, Nicholas. KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. **Nature**, v. 16, n. 485p. 363 - 367, 2012.

GONG, Jian; LIN, Canyuan; XIONG, Xiaoping; CHEN, Diyun; CHEN, Yongheng; ZHOU, Youngshun; WU, Cuiqin & DU, Yongming. Occurrence, distribution, and potential risks of environmental corticosteroids in surface waters from the Pearl River Delta, South China. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 102–109, 2019.

GRACITELLI, Mauro E.C; VIDORIS, André A.C; LUBA, Ricardo; LAZARETTI-CASTRO, Marise. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o Fio da Meada. Bases Fisiológicas para Utilização do PTH no Tratamento da Osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 3, 2002.

GRUBER, Andreas; MÜLLER, Riccarda; WAGNER, Alessa; COLUCCI, Silvia; SPASIĆ, Maja V & LEOPOLD, Kerstin. Total reflection X-ray fluorescence spectrometry for trace determination of iron and some additional elements in biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 6419 - 6429, 2020.

GRUSH, J; NOAKES, D. L. G., & MOCCIA, R. D. The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, n. 1, p. 46 - 53, 2004.

GUARNIERO, Roberto & OLIVEIRA, Lindomar G. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 9, 2004.

HANCOCK, Bruno C. & PARKS, Michael. What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals?. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 397 - 404, 2000.

HANLEY, D.A.; ADACHI, J.D.; BELL, A. & BROWN, V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. **International Journal of Clinical Practice**, v. 66, p. 1129 - 1131, 2012.

HATTNER, R; EPKER, B.N & FROST, H.M. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. **Nature**, v. 206, n. 983, p. 489 - 490, 1965.

HENDRYCH, Michal; OLEJNICKOVA, Veronika & NOVAKOVA, Marie. Calcium versus strontium handling by the heart muscle. **General Physiology and Biophysics**, v. 35, p. 13 - 23, 2016.

HERNANDEZ, Adrian V; PÉREZ-LÓPEZ, Faustino R; PISCOYA, Alejandro; PASUPULETI, Vinay; ROMAN, Yuani M; THOTA, Priyaleela & HERRERA, Antonio. Comparative efficacy of bone anabolic therapies in women with postmenopausal osteoporosis: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. **Maturitas**, v. 129, p. 12 - 22, 2019.

HOEG, Antonia; GOGAKOS, Apostolos; MURPHY, Elaine; MUELLER, Sandra; KÖHRLE, Josef; REID, David M; GLÜER, Claus C; FELSEBERG, Dieter; ROUX, Christian; EASTELL, Richard; SCHOMBURG, Lutz & WILLIAMS, Graham R. Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 11, p. 4061–4070, 2012.

HOTA, P.K; VIJAYAN, V & SINGH, L.P. Application of X-ray spectroscopic analysis to human blood samples. **Indian J. Phys.**, v. 75B, n. 4, p. 333-336, 2001.

HOWE, Douglas G; BLAKE, Judith A; BRADFORD, Yvonne M; BULT, Carol J; CALVI, Brian R; ENGEL, Stacia R; KADIN, James A; KAUFMAN, Thomas C; KISHORE, Ranjana; LAULEDERKIND, Stanley J. F; LEWIS, Suzanna E; MOXON, Sierra A. T; RICHARDSON, Joel E & SMITH, Cynthia. Model organism data evolving in support of translational medicine. **Lab Animal**, v. 47, p. 277 - 289, 2018

HOWE, K., CLARK, M., TORROJA, C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498 – 503, 2013.

HU, Qinghong; TAN, Zhou; LIU, Yukan; TAO, Jinhui; CAI, Yurong; ZHANG, Ming; PAN, Haihua; XU, Xurong & TANG, Ruikang. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 44, p. 4690 - 4698, 2007.

HUO, Lei; WANG, Lei; YANG, Zhaoyao; LI, Pingyuan; GENG, Dechun & XU, Yaozeng. Prednisolone induces osteoporosis-like phenotypes via focal adhesion signaling pathway in zebrafish larvae. **Biology Open**, v. 7, n. 7, 2018.

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. Circular Informativa n.º 006/CD/8.1.7 de 10 de janeiro de 2014. Disponível em: <<https://www.infarmed.pt/documents/15786/1097681/Protelos+e+Osseor+-+Recomenda%C3%A7%C3%A3o+para+suspens%C3%A3o/033e4fbf-4fd7-4809-8d8d-d54155a2f66c?version=1.1>>. Acesso em: 08 Jan. 2021.

IQBAL, Jameel; YUEN, Tony; KIM, Se-Min & ZAIDI, Mone. Opening windows for bone remodeling through a SLIT. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 4, p. 1255 - 1257, 2018.

ISO - Organização Internacional para Padronização. Especificação técnica: Nanotecnologias - terminologia e definições para nano-objetos - nanopartículas, nanofibras e nanoplacas. ISO / TS 80004-2: 2008. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:27687:ed-1:v2:en>>. Acesso em: 25 Dez. 2019.

JAMA. Osteoporosis Prevention, **Diagnosis and Therapy**, v. 285, n. 6, p. 785 - 795, 2001.

JEEVANANDAM, Jaison.; BARHOUM, Ahmed; CHAN, Yen S; DUFRESNE, Alain & DANQUAH, Michael K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050 - 1074, 2018.

JIMÉNEZ, Mirta; ABRADELO, Cristina; ROMÁN, Julio S. & ROJO, Luis. Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications. Review Article. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 12, p. 1974 - 1985, 2019.

JOHNSON C.C., FORDYCE F.M., RAYMAN M.P. Symposium on 'Geographical and geological influences on nutrition': Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, p. 119–132, 2010.

JONES, Richard A.L. What has nanotechnology taught us about contemporary technoscience? In: Zülsdorf, T., Coenen, C., Ferrari, A. and Fiedeler, U., (eds.) Quantum Engagements: Social Reflections of Nanoscience and Emerging Technologies. **IOS Press**, Amsterdam, 2011.

KANNIS, J. A, On behalf of the WHO Scientific Group. Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. In: Technical Report. University of Sheffield. UK WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases. **Sheffield: University of Sheffield**, 2007.

KHAN, Ibrahim, SAEED, Khalid & KHAN Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908 - 931, 2019.

KIM, B.J; LEE, Y.S; LEE, S.Y; BAEK, W.Y; CHOI, Y.J; MOON, S.A; LEE, S.H; KIM, J.E; CHANG, E.J; KIM, E.Y; YOON, J; KIM, S.W; RYU, S.H; LEE, S.K; LORENZO, J.A; AHN, S.H; KIM, H; LEE, K.U; KIM, G.S. & KOH, J.M. Osteoclast-secreted SLIT3 coordinates bone resorption and formation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 4, p. 1429 - 1441, 2018.

KIM, Min Hee; KIM, Beom Su; PARK, Hanna; LEE, Jun & PARK, Won Ho. Injectable methylcellulose hydrogel containing calcium phosphate nanoparticles for bone regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 57 - 64, 2018.

KLEIN, Gordon L. The effect of glucocorticoids on bone and muscle. **Osteoporosis and Sarcopenia**, v. 1, n. 1, p. 39 - 45, 2015.

KOBA, Wade; JELICKS, Linda A. & FINO, Eugene J. MicroPET/SPECT/CT Imaging of Small Animal Models of Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 2, p. 319 - 324, 2013.

KUMAR, R.; GILL, P.S.; RATTAN, P.J. Variations in plasma trace-elements concentration during fracture healing in dogs. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 35, n. 1, 1991.

LAUR, Nico; KINSCHERF, Ralf; POMYTKIN, Karolina; KAISER, Lars; KNES, Otto & DEIGNER, Hans-Peter. ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. **Plos One**, v. 15, n. 5, 2020.

LEDER, Benjamin Z. Optimizing Sequential and Combined Anabolic and Antiresorptive Osteoporosis Therapy. **JBMR plus**, v. 2, n. 2, p. 62 – 68, 2018.

LEE, Keon Yong; JANG, Gun Hyuk; BYUN, Cho Hyun; JEUN, Minhong; SEARSON, Peter C. Searson & LEE, Kwan Hyi. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. **Bioscience Reports**, v. 3, 2017.

LEE, Yeon H; BANG, Eun-Sook; LEE, Ji-Hyun; LEE, Jung-Dong; KANG, Dae R; HONG, Jeong & LEE, Jae-Myeong. Serum Concentrations of Trace Elements Zinc, Copper, Selenium, and Manganese in Critically Ill Patients. **Biological Trace Element Research**, v. 188, n. 2, p. 316 - 325, 2019.

LEE-LEWANDROWSKI, E; BURNETT, R.W. & LEWANDROWSKI, K. Electrolytes and Acid-Base Balance. In: McClatchey K.D. **Clinical Laboratory Medicine**, 2ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 347 - 365, 2002.

LI, Longman & YANG, Xiaobo. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1 - 11, 2018.

LI, Y. F., LUO, E., FENG, G., ZHU, S. S., LI, J. H., & HU, J. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 11, p. 1889 - 1897, 2009.

LIEN, Gunhild; FLATØ, Berit; HAUGEN, Margaretha; VINJE, Odd; SØRSKAAR, Dag; DALE, Knut; JOHNSTON, Virginia; EGELAND, Thore & FØRRE, Øystein. Frequency of Osteopenia in Adolescents With Early-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis: A Long-Term Outcome Study of One Hundred Five Patients. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 8, p. 2214 - 2223, 2003.

LIM, Sian Y. & BOLSTER, Marcy B Bolster. Profile of romosozumab and its potential in the management of osteoporosis. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 1221 - 1231, 2017.

LIMA, Sílvia A.F; WODEWOTZKY, Thaila I; LIMA-NETO, João F; BELTRÃO-BRAGA, Patrícia C.B & ALVARENGA, Fernanda C.L. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, 2012.

LOGAN, Darren W; BURN, Sally F & JACKSON, Ian J. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. **Pigment Cell Research**, v. 19, n. 3, p. 206 - 213, 2006.

LOIACOMO, César A. **Diafanização com KOH e coloração por Alizarina Red S**. Disponível em: < <http://professorcesaraugusto.blogspot.com.br/2010/12/diafanizacao-com-koh-e-coloracao-por.html>>. Acesso em: 25 Jul. 2017.

MACRAE, Calum A & PETERSON, Randall T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 721-731, 2015.

MAKRIS, George; TSELIGKA, Eirini D; PIRMETTIS, Ioannis; PAPADOPOULOS, Minas S.; VIZIRIANAKIS, Ioannis S.; PAPAGIANNOPOULOU, Dionysia. Development and pharmacological evaluation of new bone-targeted ^{99m}Tc radiolabeled bisphosphonates. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, p. 2301 – 2317, 2016.

MANOLAGAS, Stavros C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 3, p. :266 - 300, 2010.

MARIANO, Mário S; DE OLIVEIRA, Juliano E & ASSIS, Odílio B.G. Investigação do potencial zeta e do tamanho de nanopartículas em suspensão poliméricas coloidais. **Anais da III Jornada Científica - Embrapa São Carlos**, Embrapa Pecuária Sudeste e Embrapa Instrumentação - São Carlos - SP – Brasil, 2011.

MARIE, P. J; AMMANN, P; BOIVIN, G. & REY, C. Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone. **Calcified Tissue International**, v. 69, n. 3, p. 121 - 129, 2001.

MARIE, P.J., HOTT, M., MODROWSKI, D., DE POLLAK, C., GUILLEMAIN, J., DELOFFRE, P. & TSOUDEROS, Y.; An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, p. 607 - 615, 1993.

MARTINS, Marco A. T; DEL GIGLIO, Auro; MARTINS, Manoela D; PAVESI, Vanessa C.S. & LASCALA, César A. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de

bifosfonatos: importante complicação do tratamento oncológico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 41 - 46, 2009.

MATSUMOTO, Yoshinori; ROSE, Jose La; KENT, Oliver A; WAGNER, Melany J; NARIMATSU, Masahiro; LEVY, Aaron D; OMAR, Mitchell H; TONG, Jiefei; KRIEGER, Jonathan R; RIGGS, Emily; STOROZHUK, Yaryna; PASQUALE, Julia; VENTURA, Manuela; YEGANEH, Behzad; POST, Martin; MORAN, Michael F; GRYNPAS, Marc D; WRANA, Jeffrey L; SUPERTI-FURGA, Giulio; KOLESKE, Anthony J; PENDERGAST, Ann Marie & ROTTAPPEL, Robert. Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 12, p. 4482 - 4496, 2016.

MAUPIN, Kevin A.; HIMES, Evan R.; PLETT, Artur P.; CHUA, Hui Lin; SINGH, Pratibha; GHOSH, Joydeep; MOHAMAD, Safa F.; ABEYSEKERA, Irushi; FISHER, Alexa; SAMPSON, Carol; HONG, Jung-Min; CHILDRESS, Paul; ALVAREZ, Marta; SROUR, Edward F.; BRUZZANITI, Angela; PELUS, Louis M.; ORSCHELL, Christie M.; KACENA, Melissa A. Aging negatively impacts the ability of megakaryocytes to stimulate osteoblast proliferation and bone mass. **Bone**, v. 127, p. 452-459, 2019.

McCLUNG, Michael R. Romosozumab for the treatment of osteoporosis. **Osteoporosis and Sarcopenia**, v. 4, n. 1, p. 11 - 15, 2018.

McCRACKEN, Michael, ZINN, Kurt, LEMONS, Jack E., THOMPSON, John A., & FELDMAN, Dale. Radioimaging of implants in rats using Tc-99m-MDP. **Clinical Oral Implants Research**, v. 12, n. 4, p. 372 - 378, 2001.

MISRA, N. L. & SINGH MUDHER, K. D. Total reflection X-ray fluorescence: A technique for trace element analysis in materials. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, n. 1-2, p. 65 - 74, 2002.

MOGHIMI, S. M; HUNTER, A. C. & MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 311 - 330, 2005.

MONTEIRO-RIVIERE, Naney A; NEMANICH, Robert J; INMAN, Alfred O; WANG, Yunyu Y., & RIVIERE, Jim E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 3, p. 377 - 384, 2005.

MORAES, Luci F. S; SILVA, Everton N. da; SILVA, Diego A. S. & Paula, Ana P. de. Expenditures on the treatment of osteoporosis in the elderly in Brazil (2008 - 2010): analysis of associated factors. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 3, 2014.

MORENO-REYES R., EGRISE D., NEVE J., PASTEELS J.L., SCHOUTENS A. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 8, p. 1556 - 1563, 2001.

MURTHY, R. K; MORROW, P. K. & THERIAULT, R. L. Bone biology and the role of the RANK ligand pathway. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 23, n. 14 (Suppl 5), p. 9 - 15, 2009.

MYERS, M.A.; FLECK, A.; SAMPSON, B.; COLLEY, C.M.; BENT, J.; HALL, G. Early plasma protein and mineral changes after surgery: A two stage process. **Journal of Clinical Pathology**, v. 37, n. 8, p. 862 - 866, 1984.

NAKAI, Fumi, OHBAYASHI, Yumiko, NAKAI, Yasuhiro, IWASAKI, Akinori, & MIYAKE, Minoru. Bone metabolism of the jaw in response to bisphosphonate: a quantitative analysis of bone scintigraphy images. **Odontology**, v. 108, n. 4, p. 653 - 660, 2020.

NEVE, Anna; CORRADO, Addolarata & CANTATORE, Francesco P. Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 6, p. 1149 - 1153, 2012.

NICHOLS, David L. & PAVLOVIC, Andjelka. Capítulo 23: Osteoporose. Fisiologia do exercício clínico/organização. Jonathan k. Ehrman [et al.]; revisão científica Reury Frank Pereira Bacurau. - 3.ed, **São Paulo: Phorte**, 2018.

OCDE 203. GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Fish, Acute Toxicity Testing, 2019.

O'CONNOR, J.P; KANJILAL, D; TEITELBAUM, M; LIN, S.S. & COTTRELL, J.A. Zinc as a Therapeutic Agent in Bone Regeneration. **Materials**, v. 13, n. 10, 2020.

OKADA, Yukinori; ABE, Tatsuyuki; SHINOZAKI, Mio; SAKAINO, Shinjiro; GOMI, Hiromichi; NAKAJIMA, Yasuo; KOJIMA, Yasuyuki; UEJIMA, Tomoko & TSUGAWA, Koichiro. Strontium-89 Terapia para metástases ósseas do câncer de mama: efeitos do alívio da dor e fatores preditivos. **Avanços na pesquisa do câncer de mama**, v. 7, p. 250 - 257, 2018.

PANIZZI, Jennifer R; BECKER-HECK, Anita; CASTLEMAN, Victoria H; AL-MUTAIRI, Dalal; LIU, Yan; LOGES, Niki T; PATHAK, Narendra; AUSTIN-TSE, Christina; SHERIDAN, Eamonn; SCHMIDTS, Miriam; OLBRICH, Heike; WERNER, Claudius; HÄFFNERR, Karsten; HELLMAN, Nathan; CHODHARI, Rahul; GUPTA, Amar; KRAMER-ZUCKER, Albrecht; OLALE, Felix; BURDINE, Rebecca D; SCHIER, Alexander F; O'CALLAGHAN, Christopher; CHUNG, Eddie MK; REINHARDT, Richard; MITCHISON, Hannah M; KING, Stephen M; OMRAN, Heymut & DRUMMOND, Iain A. CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. **Nature Genetics**, v. 44, n.6, p. 714 – 719, 2012.

PAPAIIOANNOU, Alexandra; MORIN, Suzanne; CHEUNG, Angela M; ATKINSON, Stephanie; BROWN, Jacques P; FELDMAN, Sidney; HANLEY, David A; HODSMAN, Anthony; JAMAL, Sophie A; KAISER, Stephanie M; KVERN, Brent; SIMINOSKI, Kerry & LESLIE, William D. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada: summary. **CMAJ**, v. 182, n. 17, p. 1864 - 1873, 2010.

PARFITT, Alwyn Michael. Morphological basis of bone mineral measurements: transient and steady state effects of treatment in osteoporosis. **Journal of Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 4, p. 273 - 287, 1980.

PASQUALETTI, Sara; CONGIU, Terenzio; BANFI, Giuseppe & MARIOTTI, Massimo. Alendronate rescued osteoporotic phenotype in a model of glucocorticoid-induced

osteoporosis in adult zebrafish scale. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 1, p. 11 - 20, 2015.

PATRÍCIO, José P.; OLIVEIRA, Patrícia.; FARIA, Maria T.; PÉREZ, Maria B. & PEREIRA, Jorge. Osteoporose Induzida por Corticoides. **Serviço de Medicina Nuclear, Hospital de São João**, Porto, 2006.

PAUL, Willi & SHARMA, Chandra P. Synthesis and characterization of alginate coated zinc calcium phosphate nanoparticles for intestinal delivery of insulin. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 882 - 886, 2012.

PEKAREK, R.S.; BEISEL, W.R. Effect of Endotoxin on Serum Zinc Concentrations in the Rat. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 482 - 484, 1969.

PHILLIPS, Jennifer B & WESTERFIELD, Monte. Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 7, p. 739 - 743, 2014.

PISTELLI, Gustavo C; MARQUES, Vanessa A.S; IWAKI, Lilian C.V; SILVA, Mariliani C; PIERALISSI, Neli & TOLENTINO, Elen de S. CONTRIBUIÇÃO DA RADIOGRAFIA PANORÂMICA NO DIAGNÓSTICO DA OSTEOPOROSE. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 71 - 80, 2014.

PORS NIELSEN, S. The biological role of strontium. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 583 - 588, 2004.

QIAN, Ruiying; MA, Ying; YOU, Liuqing; ZHAO, Yanmin; LI, Shuxian; SHEN, Jue; JIANG, Lihua; YANG, Cuiwei; JIANG, Peifang; YUAN, Zhefeng; GAO, Feng & MAO, Shanshan. The Blood Levels of Trace Elements Are Lower in Children With Tic Disorder: Results From a Retrospective Study. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 2019.

RADIN, Shula; CAMPBELL, John T.; DUCHEYNE, Paul & CUCKLER, John M. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. **Biomaterials**, v. 18, n. 11, p. 777 - 782, 1997.

RADOMINSKI, Sebastião C.; BERNARDO, Wanderley; PAULA, Ana Patrícia de ; ALBERGARIA, Ben-Hur; MOREIRA, Caio; FERNANDES, Cesar E.; CASTRO, Charles H.M. ; ZERBINI, Cristiano Augusto de Freitas; DOMICIANO, Diogo S.; MENDONÇA, Laura M.C.; POMPEI, Luciano de Melo ; BEZERRA, Mailze Campos ; LOURES, Marco Antônio R. ; WENDER, Maria Celeste Osório; LAZARETTI-CASTRO, Marise; PEREIRA, Rosa M.R.; MAEDA, Sergio Setsuo; SZEJNFELD, Vera Lúcia & BORBA, Victoria Z.C. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 2, p. 452 - 466, 2017.

RAMALHO, Ana Cláudia & LAZARETTI-CASTRO, Marise. Fisiopatologia da Osteoporose Involuntiva. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, 1999.

REIS, Fábio. Cancelamento do medicamento Protos (Ranelato de estrôncio) da Servier. In: **Pfarma.com.br**, 2019. Disponível em:<

<https://pfarma.com.br/informe/4499-cancelamento-do-medicamento-protos-ranelato-de-estroncio-da-servier.html> >. Acesso em: 18 mai 2020.

RIBEIRO, Guilherme H; CHRUN, Emanuely S; DUTRA, Kamile L; DANIEL, Felipe I. & GRANDO, Liliane J. Osteonecrose da mandíbula: revisão e atualização em etiologia e tratamento. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 1, 2018.

ROCHA, Olguita G.F; LIMA, Eleonora M; OLIVEIRA, Adriane S; REIS, Fernanda A. & LEITE, Edna M.A. Teores de estrôncio sérico em pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento hemodialítico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 27, n. 1, 2005.

RODAN, Gideon A. & MARTIN, T. Jack. **Calcified Tissue International**, v. 34, 1982.

RODAN, Gideon A. & MARTIN, T. Jack. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—a hypothesis. **Calcified Tissue International**, v. 33, p. 349 - 351, 1981.

RODAN, Gideon A., & FLEISCH, Hebert A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2692 - 2696, 1996.

ROOHANI, N; HURRELL, R; KELISHADI, R. & SCHULIN, R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 144 - 157, 2013.

ROSCIOLI, Tony; KAMSTEEG, Erik-Jan; BUYASSE, Karen; MAYSTADT, Isabelle; REEUWIJK, Jeroen van; ELZEN, Christa VD; BEUSEKOM, Ellen V; RIEMERSMA, Moniek; PFUNDT, Rolph; VISSERS, Lisenka E.L.M; SCHRADERS, Margit; ALTUNOGLU, Umut; BUCKLEY, Michael F; BRUNNER, Han G; GRISART, Bernard; ZHOU, Huiqing; VELTMAN, Joris A; GILISSEN, Christian; MANCINI, Grazia M.S; DELRÉE, Paul; WILLEMSSEN, Michèl A; RAMADŽA, Danijela P; CHITAYAT, David; BENNETT, Christopher; SHERIDAN, Eamonn; PEETERS, Els A.J; TAN-SINDHUNATA, Gita M.B; DE DIE-SMULDERS, Christine E; DEVRIENDT, Koenraad; KAYSERILI, Hülya; EL-HASHASH, Osama A.E; STEMPLER, Derek L; LEFEBER, Dirk J; LIN, Yung-Yao & VAN BOKHOVEN, Hans. Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α -dystroglycan. **Nature Genetics**, v. 44, n. 5, p. 581 - 585, 2012.

RSC – ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Periodic Table. Disponível em: < <https://www.rsc.org/periodic-table/element/38/strontium> >. Acesso em: 21 Jan. 2020.

RUSSOW, Gabriele; JAHN, Denise; APPELT, Jessika; MÄRDIAN, Sven; TSITSILONIS, Serafeim & KELLER, Johannes. Anabolic Therapies in Osteoporosis and Bone Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 2019.

SAITO, Yoshiro; YOSHIDA, Yasukazu; AKAZAWA, Takashi; TAKAHASHI, Kazuhiko & NIKI, Etsuo. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 39428 - 39434, 2003.

SAKAIDA, Hiroshi; YUASA, Hiroto; FUKUTOME, Kazuo & TAKEUCHI, Kazuhiko. Pharyngolaryngeal ulcers associated with the improper use of alendronate. **Auris Nasus Larynx**, v. 44, n. 6, p. 762-765, 2017.

SALEH, Tawfik A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, 2020.

SANTOS, Ricardo A.A de L. Determinação de concentrações de elementos traço presentes no tecido sanguíneo de animais de pequeno porte através de ICP-MS. **Dissertação – Universidade Federal de Pernambuco**, 2006.

SARAIVA, Gabriela L. & LAZARETTI-CASTRO, Marise. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na prática clínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, 2002.

SARINHO, Emanuel S.C. & MELO, Verônica M. P.P. Glucocorticoid-induced bone disease: mechanism and importance in pediatric practice. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, n. 2, p. 207 - 215, 2017.

SCHAFFAZICK, Scheila R; GUTERRES, Sílvia S; FREITAS, Liane de L. & POHLMANN, Adriana R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, 2003.

SERVIER. Identificação do Medicamento: PROTOS. Disponível em:< https://servier.com.br/sites/default/files/spc-pil/15.03.26_protos_bula_paciente.pdf>. Acesso em: 26 Jan. 2019.

SHI, Lianjie; NING, Ying; XU, Liling; LI, Jianhong & ZHANG, Xuewu. Technetium-99 Conjugated with Methylene Diphosphonate Ameliorates Glucocorticoid Induced Osteoporosis by Inhibiting Osteoclastogenesis. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

SHIBAHARA, Takahiko. Antiresorptive Agent-Related Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ): ATwist of Fate in the Bone. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 247, n. 2, p. 75 - 86, 2019.

SIEBEL, Anna M. & BONAN, Carla. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. 15-56: Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações, volume 1 / organizado por Rodrigo Ribeiro Resende e Carlos Ricardo Soccol, **São Paulo: Blucher**, 2015.

SILIC, Martin R; WU, Qiuyu; KIM, Brian H; GOLLING, Greg; CHEN, Kenny H; FREITAS, Renata; CHUBYKIN, Alexander A; MITTAL, Suresh K & ZHANG, GuangJun. Potassium Channel-Associated Bioelectricity of the Dermomyotome Determines Fin Patterning in Zebrafish. **Genetics**, v. 215, n. 4, p. 1067 - 1084, 2020.

SILVENT, Jeremie; AKIVA, Anat; BRUMFELD, Vlad; REZNIKOV, Natalie; REHAV, Katya; YANIV, Karina; ADDADI, Lia & WEINER, Steve. Zebrafish skeleton development: High resolution micro-CT and FIB-SEM block surface serial imaging for phenotype identification. **Plos One**, v. 12, n. 12, 2017.

SIMS, Natalie A. & MARTIN, T John. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. **BoneKey Reports**, v. 3, n. 481, 2014.

SIQUEIRA, Daniel de. Osteoporose: uma análise ultraestrutural do tecido ósseo em camundongos C57 e ApoEKO ovariectomizados. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo**, 2014.

SOARES, Ana P; DO ESPÍRITO SANTO, Renan F; LINE, Sérgio R.P; PINTO, Maria D.G.F; SANTOS, Pablo de M; TORALLES, Maria B.P & DO ESPÍRITO SANTO, Alexandre R. Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 212-217, 2016.

SOMAROUTHU, Srikanth; OHH, Jayoung; SHAKED, Jonathan; CUNICO, Robert L; YAKATAN, Gerald; CORRITORI, Suzana; TAMI, Joe & FOEHR, Erik D. Quantitative bioanalysis of strontium in human serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Future Sci OA**, v. 1, n. 4, 2015.

SORIANO, Raquel, HERRERA, Sabina, NOGUÉS, Xavier & DIEZ-PEREZ, Adolfo. Current and future treatments of secondary osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, p. 885 - 894, 2014. SOUZA, Márcio P.G. de. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220 - 229, 2010.

SÖZEN, Tümay; ÖZİŞİK, Lale, & BAŞARAN, Nursel Ç. An overview and management of osteoporosis. **European journal of rheumatology**, v. 4, n. 1, p. 46 - 56, 2017.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHARD, M.; HUQ, K. A.; WAHAB, M. A.; AHMED, Z. F.; SMITH, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**. v. 69, p. 1435-1448, 2006.

SPENCER, R; GERLACH, G; LAWRENCE, C. & SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Review**, 2008.

STANDRING, Susan; BORLEY, Neil R.; COLLINS, Patricia; CROSSMAN, Alan R.; GATZOULIS, Michael A.; HEALY, Jeremiah C.; JOHNSON, David; MAHADEVAN, Vishy; NEWELL, Richard LM.; WIGLEY, Caroline B. Anatomia: A base anatômica da prática clínica, 4ed., **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2010.

STRACHAN, Stephanie. Trace elements. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 44 - 48, 2010.

SULCZEWSKI, Fernando B; MACHADO, Alencar K; DA CRUZ, Ivana B. M.; PIGATTO, Aline G. S; SAGRILLO, Michele R. & KRAUSE, Luciana M.F. EFEITOS GENOTÓXICOS DO EXTRATO AQUOSO DE AVENCA EM LINFÓCITOS HUMANOS. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria*, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2014.

SZOBOSZLAI, Norbert; POLGÁRI, Zsófia; MIHUCZ, Victor G & ZÁRAY, Gyula. Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, n. 1, p. 1 - 18, 2009.

TANAKA, Yoshiya; NAKAYAMADA, Shingo & OKADA, Yosuke. Osteoblasts and Osteoclasts in Bone Remodeling and Inflammation. **Current Drug Target - Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 325 - 328, 2005.

THOMAS, Thommey P; GOONEWARDENA, Sascha N; MAJOROS, Istvan J; KOTLYAR, Alina; CAO, Zhengyi; LEROUEIL, Pascale R. & BAKER Jr, James R. Folate-targeted nanoparticles show efficacy in the treatment of inflammatory arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 9, 2011.

TONELLI, Fernanda M.P; LACERDA Samyra M.N; PAIVA N.C.O; PACHECO F.G.; SCALZO JUNIOR S.R.; DE MACEDO F.H.; CRUZ J.S.; PINTO M.C.; CORRÊA JUNIOR, José D.; LADEIRA L.O.; FRANÇA L.R.; GUATIMOSIM S. & RESENDE, Rodrigo R. Functionalized nanomaterials: are they effective to perform gene delivery to difficult-to-transfect cells with no cytotoxicity?. **Nanoscale**, v. 7, n. 43p. 18036–18043, 2015.

TONELLI, Fernanda M.P; LACERDA, Samyra. M.S.N; PAIVA N.C.O; LEMOS, M S; DE JESUS, A C; PACHECO F.G; CORRÊA JUNIOR José.D.; LADEIRA L.O; FURTADO, C A; FRANÇA, L R. & RESENDE, Rodrigo R. Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials. **RSC Advances**, v. 6, p. 52636-52641, 2016.

UDENSI, Udensi K. & TCHOUNWOU, Paul B. Potassium Homeostasis, Oxidative Stress, and Human Disease. **International Journal of Clinical and Experimental Physiology**, v. 4, n. 3, p. 111 - 122, 2017.

VAN, Thuy D; TRAN, Ngoc Q; NGUYEN, Dai H; NGUYEN, Cuu K; TRAN, Dai L. & NGUYEN, Phuong T. Injectable Hydrogel Composite Based Gelatin-PEG and Biphasic Calcium Phosphate Nanoparticles for Bone Regeneration. **Journal of Electronic Materials**, v. 45, p. 2415 - 2422, 2016.

VERBERCKMOES, Steven C; DE BROE, Marc E. & D'HAESE, Patrick C. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. **Kidney International**, v. 64, n. 2, p. 534 - 543, 2003.

VRIEZE, Erik de; VAN KESSEL, M.A.H.J.; PETERS, H.M.; SPANINGS, F.A.T.; FLIK, G. & METZ, Juriaan. Prednisolone induces osteoporosis-like phenotype in regenerating zebrafish scales. **Osteoporosis International**, v. 25, 2014.

VUORI, Ilkka M. Dose-response of physical activity and low back pain, osteoarthritis, and osteoporosis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 6, p. 551 - 586, 2001.

WALKER, H.K; HALL, W.D. & HURST, J.W. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3ed. **Boston: Butterworths**, 1990.

WEINHARDT, Venera; SHKARIN, Roman; WERNET, Tobias; WITTBRODT, Joachim; BAUMBACH, Tilo & LOOSLI, Felix. Quantitative morphometric analysis of adult teleost fish by X-ray computed tomography. **Scientific Reports**, v. 8, n. 16531, 2018.

World Health Organization (WHO). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. **Geneva: World Health Organization**, 1 - 129, Technical Report Series n. 843, 1994.

YBARRA, Lorena M.; COSTA, Neuza M. B. & FERREIRA, Célia L.L.F. Calcium and iron interaction: a review. **Nutrire**, v. 22, p. 85 - 107, 2001.

YIN, Heng; WANG, Jianwei; WU, Mao; MA, Yong; WANG, Shanfu & SU, Qiuju. Preventive Effects of Evodiamine on Dexamethasone-Induced Osteoporosis in Zebrafish. **BioMed Research International**, 2019.

ZHANG, Jianjun; MUNGER, Ronald G; WEST, Nancy A; CUTLER, D Richard; WENGREEN, Heidi J. & CORCORAN, Christopher D. Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: An effect modified by smoking status. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 1, p. 9 - 17, 2006.

ZHAO, Lu; XIA, Zhidan & WANG, Fudi. Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and copper) metabolism. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 33, 2014.

ZHAO, Yinghua; WANG, Lei; LIU, Yi; AKIYAMA, Kentaro; CHEN, Chider; ATSUTA, Ikuru; ZHOU, Tao; DUAN, Xiaohong; JIN, Yan & SHI, Songtao. Technetium-99 Conjugated with Methylene Diphosphonate Ameliorates Ovariectomy-Induced Osteoporotic Phenotype without Causing Osteonecrosis in the Jaw. **Calcified Tissue International**, v. 91, p. 400 - 408, 2012.

ZITTERMANN, Armin. Magnesium deficit - overlooked cause of low vitamin D status?. **BMC Medicine**, v. 11, n. 229, 2013.

ANEXO 1



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 388/2018

Título do projeto: Desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da osteoporose

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Jose Dias Correa Junior

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2024
Belo Horizonte, 26/02/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

FIG.A1.1 - CEUA