

Natalia Sánchez Ucrós

**O USO DE FOTOBIMODULAÇÃO E DE *Lithothamnium calcareum* NO
TRATAMENTO DE OSTEOTOMIA EXPERIMENTAL EM COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia

Orientadora: Prof^a Cleuza Maria de Faria Rezende

Belo Horizonte,
UFMG - Escola de Veterinária

2010

Dedico esta dissertação aos meus amados pais, que mesmo distantes acreditaram e me apoiaram constantemente e pelo amor incondicional, Muito Obrigada.

“Animal Experimental: sob o nosso controle, ele cresce, depende e confia. Respeito haja, enquanto vivo, pois não será em vão seu sacrifício”.

(Ivan Barbosa Machado Sampaio)

“Don’t let weakness convince you that you lack of strength”.

(Miguel E. Sánchez Ucrós)

Agradecimentos

À Professora Cleuza, uma pessoa maravilhosa com quem tive o prazer de trabalhar, pela paciência, confiança, ensinamentos, orientação e pelo incentivo à pesquisa que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada por tudo!

Ao professor Walter Motta pela co-orientação e financiamento do projeto.

Aos meus pais Alberto e Cecilia por acreditarem em mim, pelo amor e apoio incondicionais, e aos meus irmãos Miguel e Felipe sempre presentes na minha vida, mesmo que distantes.

Ao Andrés por fazer parte da minha vida e ter compartilhado todos os momentos difíceis, pelo constante apoio, paciência e amor.

À Faculdade de Farmácia da UFMG.

À professora Simone Odília Diniz e ao professor Valbert Nascimento Cardoso da faculdade de farmácia pelos ensinamentos, orientação e confiança na realização das cintilografias ósseas.

À AptivaLux pelo empréstimo do equipamento FisiOLED, utilizado nesta pesquisa.

Ao professor Marcos Pinotti Barbosa da Escola de Engenharia da UFMG, pela orientação.

Ao professor Renato Cesar Sacchetto Torres, pela ajuda nas radiografias e à professora Marlene Isabel Várgas Vilorio, pela ajuda na histologia.

Aos meus pais e irmãos adotivos no Brasil, Rubén, Esperanza, Lulu, Paulo e Nat, que sem vocês não teria conseguido realizar este sonho!. Por me acolher na sua casa como filha e por ter me dado a oportunidade de me iniciar na pesquisa no laboratório de cultura celular! MUCHAS GRACIAS!!! Los llevaré siempre en mi corazón.

Aos meus caros amigos colombianos Anita, Ximena, Raul (Jauuuuu), Omitar, Ramon e Jair por fazer a minha vida no Brasil mais agradável, pela companhia, almoços colombo-brasileiros e momentos de grande descontração.

Aos amigos do laboratório LEMB na Faculdade de Química da UFMG, especialmente à Alinne Martins (Alinninha), quem se preocupou por mim como uma irmã, por nossas viagens e longas conversas, OBRIGADA. Mas também ao Joel, Fred, Juliana, Eliete, Ana Celeste, Arlete, Luciana, Henrique...

À Natalie Bórges, colega de orientação, que juntas caminhamos nesse percurso tão semelhante dividindo aflições e multiplicando alegrias, por estar sempre presente e disposta a me ajudar, pelos conselhos e amizade.

Aos colegas e amigos da veterinária Juliana, Plínio, Priscilla, Endrigo, Stephane, Priscilla Fantini, Felipe, Luana.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UFMG: Oscar, Carlos (cachorrinho), Terezinha, Anirton, Sr. Ronaldo, Sr. Joaquim, Elizete, Jouse.

Aos alunos da faculdade de farmácia, Carol, Pequena e Leo sempre dispostos a colaborar.

Aos Professores e funcionários da Escola de Veterinária, à professora Ângela Maria Quintão Lana, à professora Natacha, e ao Danilo pela análise estatística, ao Sr. Eli e ao Eduardo pela realização das radiografias, à Renata pela análise bioquímica no laboratório de Patologia Clínica, ao pessoal do Laboratório de Metabolismo Animal.

Aos meus coelhos, razão desta pesquisa, sempre lembrarei de vocês, OBRIGADA.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos através do Programa de Estudantes Convênio de Pósgraduação (PEC-PG) entre o Brasil e a Colômbia.

Em fim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
GLOSARIO.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. LITERATURA CONSULTADA.....	20
TECIDO ÓSSEO.....	20
FOTOBIMODULAÇÃO.....	25
<i>Lithothamnium calcareum</i>	29
METABOLISMO DO CÁLCIO EM COELHOS.....	32
CINTILOGRAFIA ÓSSEA.....	34
TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	37
HISTOLOGIA.....	39
ANESTESIA EM COELHOS.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
FORMULAÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	43
GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	46
DESEMPENHO PRODUTIVO.....	46
AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	46
AVALIAÇÃO LABORATORIAL.....	47
CINTILOGRAFIA ÓSSEA.....	48
DENSITOMETRIA ÓSSEA.....	53
HISTOLOGIA.....	54
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÕES.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição mineral do Suminal®.....	31
Tabela 2	Sistema internacional de conversão e unidades convencionais de radioatividade.....	36
Tabela 3	Tempos de realização dos exames de radiografia, cintilografia óssea, densitometria óssea e histologia.....	40
Tabela 4	Tempos de realização das avaliações clínica e laboratorial.....	41
Tabela 5	Composição das dietas experimentais.....	44
Tabela 6	Valores calculados da composição nutricional das dietas experimentais.....	44
Tabela 7	Distribuição dos grupos experimentais.....	45
Tabela 8	Escore de avaliação radiográfica para consolidação de osteotomia experimental.....	47
Tabela 9	Fatores de conversão de unidades.....	48
Tabela 10	Escore de avaliação histológica para consolidação de osteotomia experimental.....	55
Tabela 11	Media de consumo diário e ganho de peso de coelhos alimentados com dieta convencional e dieta com inclusão de <i>L. calcareum</i> (0,75%).....	63
Tabela 12	Comparação entre tratamentos das médias corrigidas da variável consumo.....	63
Tabela 13	Comparação entre tratamentos das médias corrigidas da variável ganho de peso.....	63
Tabela 14	Média dos valores da concentração sérica de Ca (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.....	66
Tabela 15	Média dos valores da concentração urinárias de Ca (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.....	66
Tabela 16	Valores de referência do Ca sanguíneo em coelhos segundo diferentes autores.....	66
Tabela 17	Valores de referência de FA em sangue de coelhos segundo diferentes autores.....	68
Tabela 18	Media dos valores séricos de FA (UI/L) nos diferentes grupos experimentais em função do tempo avaliado.....	68
Tabela 19	Media dos valores urinários de FA (UI/L) nos diferentes grupos experimentais em função do tempo avaliado.....	68
Tabela 20	Valores de referência de P sanguíneo em coelhos segundo diferentes autores.....	70
Tabela 21	Comparação entre as médias dos valores da concentração sérica de P (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.....	70
Tabela 22	Comparação entre as médias dos valores da concentração urinária de P (mmol/L) nos	

	diferentes tratamentos em função do tempo experimental.....	70
Tabela 23	Comparação dos valores das medianas dos parâmetros Reação Periosteal (RP), formação de Ponte Óssea (PO), formação de Calo Ósseo (CO), presença de Linha de Fratura (LF) e Remodelação (R), avaliados nos diferentes tempos T0 (antes da cirurgia), T15 (15 dias), T30 (30 dias), T45 (45 dias), T60 (60 dias).....	72
Tabela 24	Comparação dos valores das medianas dos parâmetros Reação Periosteal (RP), formação de Ponte Óssea (PO), formação de Calo Ósseo (CO), presença de Linha de Osteotomia (LO) e Remodelação (R), avaliados nos diferentes tratamentos. A (<i>L. calcareum</i>), B <i>L. calcareum</i> +LED, (C) LED, (D) controle.....	72
Tabela 25	Comparação entre as médias do IA da fase de FLUXO (cpm) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental. A (<i>L. calcareum</i>), B (<i>L. calcareum</i> +LED), C (LED), D (controle).....	84
Tabela 26	Comparação entre as médias do IA da fase de POOL (cpm) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental. A (<i>L. calcareum</i>), B (<i>L. calcareum</i> +LED), C (LED), D (controle).....	84
Tabela 27	Comparação entre as médias do IA da fase ESTÁTICA (cpm) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental. A (<i>L. calcareum</i>), B (<i>L. calcareum</i> +LED), C (LED), D (controle).	84
Tabela 28	Valores das medias da densidade óssea nos diferentes tratamentos.....	94
Tabela 29	Valores das medianas da avaliação histológica nos diferentes tratamentos. (CO) presença de calo ósseo, (UO) união óssea, (R) remodelação.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica da estrutura microscópica do osso cortical. (a) Esquema 3D do osso cortical, (b) corte do sistema de Havers, (c) fotomicrografia de um sistema de Havers. (Tomado de Doublaré <i>et al.</i> 2004).....	21
Figura 2	Esquema do suprimento sanguíneo de um osso longo maduro. (Tomado de Denny e Butterworth, 2000).....	21
Figura 3	Ilustração esquemática da consolidação óssea secundária. (a) Formação do hematoma no sitio da fratura. (b) Substituição do hematoma por calo ósseo. (c) Processo de remodelação óssea. (Tomado de Denny e Butterworth, 2000).....	22
Figura 4	Desenho da ossificação primaria apresentada nas fixações rígidas (tomado de Kaderly, 1991).....	23
Figura 5	Representação gráfica da consolidação óssea secundária. Calo ósseo após nove dias da fratura mostrando osso maturo sob o periosteio (ossificação intramembranosa) e abundancia de tecido cartilaginoso adjacente à fratura (condrogenese) (Fonte: Doblare <i>et al.</i> 2004).....	24
Figura 6	Esquema apresentando o modelo de estimulação biológica pela radiação laser de baixa energia (Tomado de Smith, 1991).....	27

Figura 7	Desenho apresentando as principais diferenças entre a luz do sol, a luz do LED e a luz do <i>laser</i>	28
Figura 8	Imagem fotográfica do <i>Lithothamnium calcareum</i> na forma morta (Tomado de Melo e Moura, 2009).....	30
Figura 9	Desenho esquemático apresentando a distribuição do radiotraçador no corpo após administração intravenosa.....	36
Figura 10	Esquema da aquisição helicoidal da imagem tomográfica e o distanciamento entre os cortes (Modificado de Muñiz e Casanovas, 2006).....	38
Figura 11	Esquema de um sistema de TC helicoidal multicortes apresentando a varredura do raio X colimado atravessando o corpo e sendo captado por vários detectores (Tomado de Lopez-Ben <i>et al.</i> 2006).....	38
Figura 12	Imagens fotográficas apresentando os procedimentos cirúrgicos da osteotomia (A) Afastadores de Homman (setas) expondo os fragmentos ósseos após osteotomia do terço médio da tíbia, (B) Pinça autocentrante (seta preta) segurando o foco da osteotomia no terço médio da tíbia durante a introdução dos pinos intramedulares (seta amarela) com auxílio de perfurador manual (seta branca), (C) Coaptação dos fragmentos ósseos (seta) após a osteossíntese.....	43
Figura 13	Imagem fotográfica do equipamento LED. Esquerda: aparelho FisiLed® da MMOptics; direita acima: óculos de proteção; direita abaixo: fonte de energia.....	45
Figura 14	Imagem fotográfica mostrando o posicionamento do coelho e a forma de aplicação do LED na face cranial da tíbia direita sobre o foco da osteotomia.....	45
Figura 15	Imagem fotográfica da Gamacâmara Nucline TH/22. (A) Detector de radiação, colimador LEHR (seta). (B) computador de aquisição de imagens.....	49
Figura 16	Representação esquemática do sistema de radiocromatografia para controle de qualidade do ^{99m} Tc-MDP.....	50
Figura 17	Imagem fotográfica apresentando o posicionamento do coelho na gamacâmara durante a cintilografia óssea. (A) vista lateral esquerda do coelho com o colimador (seta) na região pélvica, (B) vista posterior do coelho posicionado sob o colimador (seta).....	51
Figura 18	Imagem digital da fase de fluxo apresentando a captação da radioatividade do ^{99m} Tc-MDP chegando progressivamente nos membros pélvicos, desde o fêmur até os metatarsos (vista ventro-dorsal).....	51
Figura 19	Imagem cintilográfica da fase tissular ou de equilíbrio. (A) captação da radioatividade do ^{99m} Tc-MDP nos membros pélvicos direito (seta branca) e esquerdo (seta amarela), desde o terço proximal do fêmur até os metatarsos, com a cauda entre eles (projeção ventro-dorsal) (B) imagem anterior apresentando a área de interesse (ROI), selecionada desde a articulação fêmoro-tíbio-patelar (seta branca) até a articulação tíbio-metatarsal (seta amarela) nos dois membros.....	52
Figura 20	Imagem cintilográfica da fase estática de fixação óssea. (C) captação da radioatividade do ^{99m} Tc-MDP nos membros pélvicos direito (seta branca) e esquerdo (seta amarela), desde o terço proximal do fêmur até os metatarsos, com a cauda entre	

	eles (projeção ventro-dorsal) (D) imagem anterior apresentando a área de interesse (ROI), selecionada desde a articulação fêmoro-tíbio-patelar (seta branca) até a articulação tíbio-metatarsica (seta amarela) nos dois membros.....	52
Figura 21	Imagem fotográfica dos fragmentos ósseos afixados na placa de isopor para a realização da tomografia computadorizada.....	54
Figura 22	Imagem tomográfica digital apresentando a forma de seleção da região de interesse (ROI) (seta amarela).....	54
Figura 23	Imagem fotográfica da radiografia pósoperatória imediata, mostrando as duas cerclagens para fixação da fissura no fragmento proximal de tíbia.....	60
Figura 24	Imagem fotográfica da radiografia pósoperatória mostrando a impactação dos fragmentos proximal e distal da tíbia.....	61
Figura 25	Gráfico das médias dos parâmetros (A) peso e (B) consumo dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	64
Figura 26	Gráfico do comportamento das concentrações sérica e urinária de cálcio (Ca) em função do tempo.....	67
Figura 27	Gráfico apresentando o comportamento da concentração sérica e urinária de cálcio (Ca). Comparação entre grupos experimentais.....	67
Figura 28	Gráfico do comportamento das concentrações sérica e urinária de cálcio (Ca) em função do tempo.....	68
Figura 29	Gráfico apresentando o comportamento da concentração sérica e urinária de fosfatase alcalina (FA). Comparação entre grupos experimentais.....	69
Figura 30	Gráfico apresentando o comportamento da concentração sérica e urinária de fósforo (P). Comparação entre grupos experimentais.....	71
Figura 31	Gráfico do comportamento da concentração sérica e urinária de fósforo (P) em função do tempo.....	71
Figura 32	Imagem fotográfica da radiografia pós-operatória imediata. Observa-se a osteossíntese e a linha da osteotomia no terço médio da tíbia (seta branca) em projeção ML. (A) grupo A – <i>L. calcareum</i> , (B) grupo B - <i>L. calcareum</i> +LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.....	73
Figura 33	Imagem fotográfica da radiografia 15 dias de pós-operatório. Observa-se formação de calo ao redor da osteotomia no terço médio da tíbia (projeção ML) com superfície irregular, linha de osteotomia menos definida e início da formação de ponte óssea. (A) grupo A – <i>L. calcareum</i> , (B) grupo B - <i>L. calcareum</i> +LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.....	75
Figura 34	Imagem fotográfica da radiografia 30 dias de pós-operatório. Observa-se o calo ao redor da osteotomia no terço médio da tíbia com superfície lisa (projeção ML), presença da linha de osteotomia parcial e pouco definida e formação de ponte óssea	

	completa. (A) grupo A – <i>L. calcaireum</i> , (B) grupo B - <i>L. calcaireum</i> +LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.....	75
Figura 35	Imagem fotográfica da radiografia 45 dias de pós-operatório. Observa-se calo ósseo discreto com superfície lisa e densidade mineral semelhante àquela da cortical (projeção ML). (A) grupo A – <i>L. calcaireum</i> , (B) grupo B - <i>L. calcaireum</i> +LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D – Controle.....	79
Figura 36	Imagem fotográfica da radiografia 60 dias de pós-operatório., Observa-se calo ósseo discreto com superfície lisa e visibilização difusa do canal medular do lado direito do pino (projeção ML). (A) grupo A – <i>L. calcaireum</i> , (B) grupo B - <i>L. calcaireum</i> +LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.	81
Figura 37	Gráfico do comportamento da captação de ^{99m} Tc-MDP, pelo tecido ósseo, em função do tempo experimental (T0,T15,T30,T45,T60) comparando as três fases (Fluxo, <i>Pool</i> e Estática).	85
Figura 38	Imagem digital da cintilografia óssea, projeção ventro-dorsal dos membros pélvicos no T0 - controle. (a) fase de Fluxo, (b) fase de <i>Pool</i> , (c) fase Estática.....	87
Figura 39	Imagem digital da cintilografia óssea, projeção ventro-dorsal dos membros pélvicos no T15 – 15 dias de pós-operatório. (d) fase de Fluxo, (e) fase de <i>Pool</i> , (f) fase Estática.....	87
Figura 40	Imagem digital da cintilografia óssea, projeção ventro-dorsal dos membros pélvicos no T30 – 30 dias de pós-operatório. (g) fase de Fluxo, (h) fase de <i>Pool</i> , (i) fase Estática.....	89
Figura 41	Imagem digital da cintilografia óssea, projeção ventro-dorsal dos membros pélvicos no T45 – 45 dias de pós-operatório. (j) fase de Fluxo, (k) fase de <i>Pool</i> , (l) fase Estática.....	89
Figura 42	Imagem digital da cintilografia óssea, projeção ventro-dorsal dos membros pélvicos no T60 – 60 dias de pós-operatório. (m) fase de Fluxo, (n) fase de <i>Pool</i> , (o) fase Estática.....	91
Figura 43	Gráfico do comportamento da captação de ^{99m} Tc-MDP, pelo tecido ósseo nas três fases (Fluxo, <i>Pool</i> e Estática), comparando entre tratamentos (A,B,C,D).....	94
Figura 44	Gráfico apresentando as médias da densidade mineral óssea (UH). Comparação entre grupos experimentais.....	95
Figura 45	Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo A (x4). União óssea (seta azul), fenda de osteotomia (seta preta), osso antigo (estrela preta) e osso novo (estrela azul).....	97
Figura 46	Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo B (x4). Observam-se áreas de união óssea (seta azul), linha da osteotomia (seta preta) com áreas de reabsorção da superfície óssea pelos osteoclastos (estrela amarela), calo ósseo (estrela preta).....	97
Figura 47	Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo C (x4). União óssea (seta azul), fendas de não união (seta preta), osso antigo (estrela preta) e osso novo (estrela azul).....	99

GLOSSÁRIO

μCi: microcurie	mEq/L: miliequivalentes por litro
μL: microlitros	mEq: miliequivalentes
⁹⁸ Mo: molibdênio inativo	mg/kg: miligramas por kilo
⁹⁹ Mo: molibdênio radioativo	mg/dL: miligramas por decilitro
^{99m} Tc: ^{99m} tecnécio (isômero metastável)	Mg: magnésio
^{99m} Tc-NaTcO ₄ : pertecnetato de sódio	mg: miligramas
^{99m} Tc-MDP: metildifosfonato de tecnécio	MG: Minas Gerais
^{99m} TcO ₄ ⁻ : íon de pertecnetato	ML: médio-lateral
ANAVA: análise de variância	mL: mililitros
BH: Belo Horizonte	mm: milímetros
Bq: becquerel	Mn: manganês
Ca: cálcio	Mo: molibdênio
CC: crânio-caudal	MPD: membro pélvico direito
CCD: Cromatografia em camada delgada	mW/cm ² : Miliwatts por centímetro quadrado
Ci: curie	mW: miliwatts
cm ² : centímetro quadrado	NaTcO ₄ : pertecnetato de sódio
CO: calo ósseo	nm: nanômetros
cpm: captações por minuto	O ₂ : oxigênio
CV: coeficiente de variação	P: fósforo
dL: decilitro	PO: ponte óssea
DMO: densidade mineral óssea	ppm: partes por milhão
dps: desintegrações por segundo	PTH: paratormônio
FA: fosfatase alcalina	PVPI: iodopolivinilpirrolidona
Fe: ferro	R: remodelação
g: gramas	ROI: <i>Region of Interest</i> – região de interesse
GaAlAs: gálio alumínio arsênico	RP: reação periosteal
HE: Hematoxilina-eosina	Sn: estanho
HU: unidades <i>Hounsfield</i> – <i>Hounsfield Units</i>	SnCl ₂ : cloreto estanhoso
IA: Índice de Atividade	SNK: <i>Student-Newman-Keuls</i>
J/cm ² : joules por centímetro quadrado	T0a: tempo zero a
J: joules	T0b: tempo zero b
KeV: kiloeletrovolt	T15: tempo 15 dias
Kg: kilogramas	T30: tempo 30 dias
<i>L. calcareum: Lithothamnium calcareum</i>	T45: tempo 45 dias
L: litro	T60: tempo 60 dias
LED: <i>Light Emitting Diodes</i>	Tc: tecnécio
LEHR: <i>Low Energy High Resolution</i>	TC: tomografia computadorizada
LLLT: <i>Low-Level Light Therapy</i> – Terapia de baixa energia	UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
LO: presença de linha de osteotomia	UFV: Universidade Federal de Viçosa
mA: miliampères	UI/L: unidades internacionais por litro
mCi: milicurie	Zn: zinco
MDP: metildifosfonato	

RESUMO

Objetivou-se nesta pesquisa avaliar os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum*, da irradiação com LED e da associação destes dois tratamentos na consolidação de osteotomia experimental em coelhos, por meio de exames radiográfico, cintilografia óssea, densitometria óssea e histologia. Utilizaram-se 20 coelhos machos da raça Nova Zelândia, de 4 a 5 meses de idade, com massa corporal média de 2,5Kg, que foram submetidos a osteotomia do terço médio da tíbia direita e fixação interna com dois pinos intramedulares. Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (A,B,C,D) com cinco animais cada. O grupo A recebeu diariamente dieta contendo 0,75% de *L. calcareum*, o B recebeu a mesma dieta associada ao tratamento com LED (50mW de potência, 870nm de comprimento de onda) durante sete semanas, utilizando densidade energética de 12J/cm² em irradiação contínua durante 120 segundos em quatro pontos ao redor do foco da osteotomia. O grupo C recebeu a irradiação com LED e o grupo D constituiu o controle sem tratamento adicional à fixação da osteotomia. A evolução clínica ocorreu sem intercorrências. A irradiação com LED foi de fácil aplicação, sem estresse para os animais, bem como as avaliações radiográficas que foram realizadas somente com contenção manual. As avaliações clínica e laboratoriais foram feitas semanalmente e as radiografias e cintilografias, antes do estudo e em intervalos de 15 dias até o final do experimento. A densitometria óssea e a histologia foram realizadas aos 60 dias. Os resultados laboratoriais se mostraram dentro dos parâmetros fisiológicos. As avaliações radiográficas e cintilográficas permitiram acompanhar a evolução do processo de consolidação que ocorreu em todos os casos. Observou-se semelhança das imagens radiográficas entre os grupos A e D e entre B e C. O calo ósseo nestes dois últimos mostrou evolução discretamente mais lenta. Histologicamente verificou-se consolidação completa em todos os animais do grupo D (controle), em nenhum do grupo B, em 75% do grupo A e em 60% do grupo C. Dos resultados pode-se concluir que embora tenha ocorrido a consolidação clínica e radiográfica aos 60 dias em todos os casos, histologicamente o grupo controle (D) foi melhor, mostrando que o organismo sadio não necessita de estímulo para o processo de reparação óssea. O grupo B, da associação do LED e *L. calcareum*, foi o de resposta mais lenta. Novas pesquisas devem ser realizadas para avaliar o efeito da suplementação mineral e do estímulo de luz biomoduladora em animais portadores de deficiências minerais e alterações osseas.

Palavras-chave: *Lithothamnium calcareum*, fotobiomodulação, cintilografia óssea, coelho, osteotomia.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate LED irradiation in the consolidation of experimental osteotomy in rabbits, by radiographic, bone scintigraphy and histology examinations. Twenty male, New Zealand, white rabbits, 4-5 months of age with an average body mass of 2.5kg, were surgically induced mid-tibial osteotomies, fixed with two intramedullary pins. The animals were randomly divided into two experimental groups (A,B,C,D). The group A received diet containing 0.75% of *L. calcareum*, group B receive the same diet and LED irradiation (50mW of power and 870nm of wave leng), with energy density of 12J/cm² and continues outflow irradiation for 120 seconds in four points around the osteotomy. Group C received the LED only and group D served as a control without further tratement of the osteotomy fixation. LED irradiation was easy to perform to the animals as well as the radiographic evaluations, bouth were performed using only manual restraint. The clinical and laboratory assessments were made weekly and radiographs and bone scintigraphies were done every 15 days until the end of the experiment. Bone density scans and histology were performed at day 60. Radiographs and bone scintigraphies show consolidation in all cases. A radiographic similarity was observed in the images between groups A and D and between B and C. The callus development in grups B and C was slightly slower. Histologically there was bone consolidation in all animals of group D (control), none in group B, 75% in group A and 60% in group C. From the results we can conclude that, although there was clinical and radiographic bone consolidation in all cases after 60 days, the control group proved to be better histologically, showing that a healthy organism needs no aid to repair bone. In Group B, the association of LED and *L. calcareum* showed a slower response. Further research should be conducted to assess the effects of mineral supplementation and photobiomodulation on animals with mineral deficiencies and bone alterations.

Keywords: *Lithothamnium calcareum*, photobiomodulation, bone scintigraphy, rabbits, osteotomy.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo, considerado um tecido estrutural e metabólico, proporciona suporte e estrutura mecânica ao tecido mole protegendo o cérebro e os órgãos da cavidade torácica e participa do metabolismo mineral e da hematopoiese (Doblaré *et al.* 2004; Samuelson, 2007). Esse tecido tem uma grande capacidade de regeneração, é provido de força e rigidez, possui elasticidade limitada e quando lesado, inicia-se uma série de reações que sob condições normais, têm o potencial para restaurar a arquitetura e propriedades mecânicas do tecido (Webb e Tricker, 2000; Hungria, 2007; Schindeler *et al.* 2008). Entretanto, a consolidação das lesões ósseas pode ser influenciada por diversos fatores como o tipo, duração e intensidade do trauma, resposta inflamatória, suprimento sanguíneo, idade do paciente, doenças e estados metabólicos e nutricionais, redução, estabilização da fratura, carga e movimento (Khadra *et al.* 2004; Perumal e Roberts, 2007). Muito embora em condições normais a maioria das fraturas não apresente problemas de consolidação, existem algumas situações em que o tecido ósseo não responde convenientemente. Algumas condições sistêmicas como má nutrição, diabete, osteoporose, infecções, redução ou perda do suprimento sanguíneo, instabilidade biomecânica, ausência de contato ósseo, magnitude da lesão e fatores iatrogênicos podem comprometer a consolidação óssea levando à união retardada ou à não-união (Denny e Butterworth, 2000; Doblaré *et al.* 2004).

Diferentes métodos terapêuticos têm sido pesquisados na tentativa de promover aceleração ou melhora do processo de regeneração óssea, como o uso de fatores de crescimento, células tronco, auto e alo-enxertos (Rijk *et al.* 2003), fontes fotobiomoduladoras (Desmet *et al.* 2006), suplementos alimentares (Doetsch *et al.* 2004), dentre outros (Öztürk *et al.* 2008). Porém, muitos deles apresentaram resultados ainda inconsistentes e controversos, talvez em parte, pela falta de padronização dos tratamentos para as diferentes espécies e situações clínicas em que foram utilizados.

A terapia com fontes de luz de baixa intensidade, conhecida como fotobiomodulação, utiliza fontes monocromáticas e espectros de luz desde o vermelho visível até o infravermelho próximo, tem sido empregada tanto *in vitro* quanto *in vivo* com resultados variáveis (Matsuzaka *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007; Kim *et al.* 2008). Este tipo de tratamento baseia-se na capacidade da luz no espectro vermelho ou infravermelho próximo de alterar, direta ou indiretamente, o metabolismo celular como resultado da absorção por fotoreceptores presentes nas células (Karu, 1999; Desmet *et al.* 2006; Mikail, 2009). Uma das fontes fotobiomoduladoras são os diodos emissores de luz (LED – *Light Emitting Diode*) que vêm sendo introduzidos na prática clínica como alternativa terapêutica à laserterapia e têm demonstrado efeitos anabólicos semelhantes sobre diferentes tecidos,

modulando as funções celulares (Vinck *et al.* 2003; Casalechi *et al.* 2008).

Essas fontes fotobiomoduladoras são métodos terapêuticos clinicamente aceitos para o tratamento da dor e na reparação de tecidos moles como feridas infectadas, isquêmicas e hipóxicas, lesões da retina, mucosa oral, coração e nervo óptico (Whelan *et al.* 2001; Brawn e Kwong-Hing 2007; Corazza *et al.* 2007). Recentemente, efeitos anabólicos sobre as células precursoras dos osteoblastos também foram demonstrados, o que indica um efeito benéfico do LED sobre as células ósseas, sugerindo seu potencial para aplicação clínica nas patologias deste tecido (Kim *et al.* 2008). A maioria dos estudos que sugerem efeitos anabólicos sobre o tecido ósseo tem utilizado o *laser* como fonte biomoduladora (Guzzardella *et al.* 2003; Pinheiro e Gerbi, 2006; Liu *et al.* 2007). Esses resultados indicam que a luz, sob condições especiais de aplicação, pode modular benéficamente a resposta do tecido ósseo. No entanto, as controvérsias levantadas e a escassa literatura disponível com emprego do LED parecem indicar, que a fotobiomodulação como método terapêutico das patologias do tecido ósseo, ainda não está totalmente estabelecida e desta forma, mais pesquisas precisam ser conduzidas para o entendimento dos mecanismos celulares que levam aos efeitos anabólicos do LED. Também, é necessário padronizar os protocolos terapêuticos para fornecer resultados objetivos e replicáveis que comprovem a eficácia desta terapia, com vista à indicação do melhor potencial terapêutico do LED no tecido ósseo.

Outro método que tem sido utilizado para auxiliar no processo de reparação óssea é o

uso dos nutracêuticos, que podem proporcionar benefícios com a prevenção ou o tratamento de doenças metabólicas (Andlauer e Furst, 2002). O *Lithothamnium calcareum*, uma alga marinha rica em elementos minerais, principalmente cálcio e magnésio, utilizada na nutrição animal, demonstrou ter efeitos variáveis (Dias, 2001; Melo e Moura, 2009). A sua utilização na alimentação animal foi avaliada em diferentes espécies melhorando a saúde dos animais, o ciclo reprodutivo e a qualidade dos derivados, como carne, leite e ovos (Pope *et al.* 2002; Melo *et al.* 2008, Euler, 2009). A vantagem desta fonte mineral é sua alta solubilidade, fator diretamente relacionado à absorção intestinal e à biodisponibilidade do produto no organismo (Orsine *et al.* 1989; Melo *et al.* 2006). Existem poucas pesquisas publicadas relatando os efeitos desta alga calcária sobre o tecido ósseo. Porém, já foram sugeridos efeitos anabólicos sobre os ossos, estimulando o crescimento (Assoumani, 1997, Pope *et al.* 2002) e recentemente na consolidação de fratura (Palhares *et al.* 2008) e falha óssea (Teixeira, 2008). Pesquisas ainda devem ser conduzidas para se estudar o efeito do *L. calcareum* sobre o tecido ósseo e mais especificamente na consolidação de fraturas.

Desse modo, o conhecimento adicional nos tratamentos existentes e a busca de novos métodos não invasivos que estimulem a consolidação óssea adquirem considerável importância. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da fotobiomodulação, do *Lithothamnium calcareum* e da associação destes dois tratamentos na consolidação de osteotomia experimental em coelhos, por meio de exames clínico, radiográfico,

cintilografia óssea, densitometria óssea e histologia.

LITERATURA CONSULTADA

Tecido Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo, duro especializado e que possui importantes funções estruturais e metabólicas (Doblaré *et al.* 2004; Samuelson, 2007). A habilidade deste tecido em armazenar minerais, em especial cálcio, principalmente na forma de cristais de hidroxapatita, é uma das características que o diferencia dos outros tecidos conectivos (Samuelson, 2007). No coelho o esqueleto é mais frágil que em outras espécies e representa 8% do peso corporal total (Harkness e Wagner, 1993; Mader, 1997).

No adulto, o osso lamelar pode ser cortical (compacto) ou trabecular (esponjoso). Microscopicamente, o osso cortical possui um osteon ou sistema de Havers orientado longitudinalmente, onde a matriz extracelular é depositada em camadas concêntricas ao redor do canal vascular central chamado canal de Havers. Dentre as camadas podem-se observar lacunas que contém os osteócitos (figura 1) (McDowell, 1992; Webb e Tricker, 2000, Doblaré *et al.* 2004).

No osso compacto, fibras nervosas e vasos sanguíneos, passam pelo canal de Havers e pelos canalículos até chegar aos osteócitos. O osso trabecular recebe o aporte sanguíneo do endóstio no canal medular. Os canais de Volkmann são transversais e oblíquos e

unem tanto os canais de Havers quanto o sistema vascular do endóstio e do perióstio (figura 1) (Samuelson, 2007).

O suprimento sanguíneo do osso maduro normal deriva-se da circulação sistêmica, através de artérias nutritivas, metafisárias e periosteais (Doige, 1990; Denny e Butterworth, 2000). O fluxo normal do sangue através do córtex diafisário dos ossos longos é de forma centrífuga, da medula para o perióstio (Wilson, 1991). O sistema vascular aferente encontra-se na cavidade medular do osso e é constituído pela artéria nutritiva e pelas artérias metafisárias proximal e distal. A artéria nutritiva atravessa a cortical e penetra na cavidade medular onde se divide em artérias ascendentes e descendentes nutrindo o endóstio da região diafisária do osso (Wilson, 1991; Denny e Butterworth, 2000). As metafises ósseas são supridas pelas múltiplas artérias metafisárias que se unem às artérias diafisárias (Wilson, 1991). Nos ossos longos, medula e córtex possuem vascularização paralela, por meio de ramos vasculares que derivam-se da artéria nutritiva. O ramo que nutre o córtex divide-se para suprir os vasos dos canais de Havers (figura 2) (Wilson, 1991).

O perióstio, que encontra-se unido ao osso e em contato externo com a musculatura, possui vasos sanguíneos, tecido conectivo fibroso denso e células osteogênicas (Eurell e Van Sickle, 2006; Samuelson, 2007). Sua vascularização consiste em vênulas e arteríolas que provêm um aporte sanguíneo restrito, atingindo apenas um quarto a um terço da espessura da cortical, onde se anastomosam com os capilares do sistema arterial medular. A pressão do fluxo sanguíneo medular parece limitar o fluxo

periosteal para a parte interna do córtex (figura 2) (Wilson, 1991).

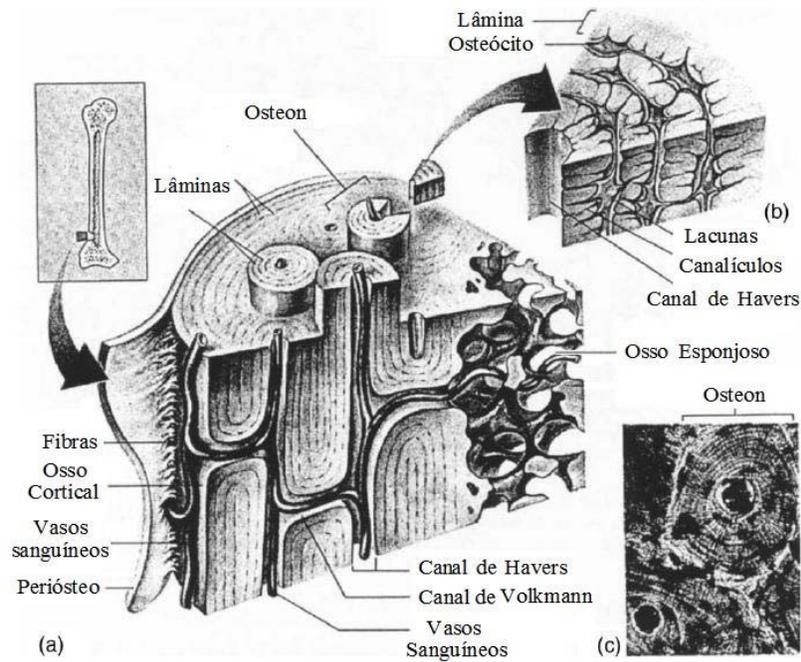


Figura 1. Representação gráfica da estrutura microscópica do osso cortical. (a) Esquema 3D do osso cortical, (b) corte do sistema de Havers, (c) fotomicrografia de um sistema de Havers. (Tomado de Doublaré *et al.* 2004).

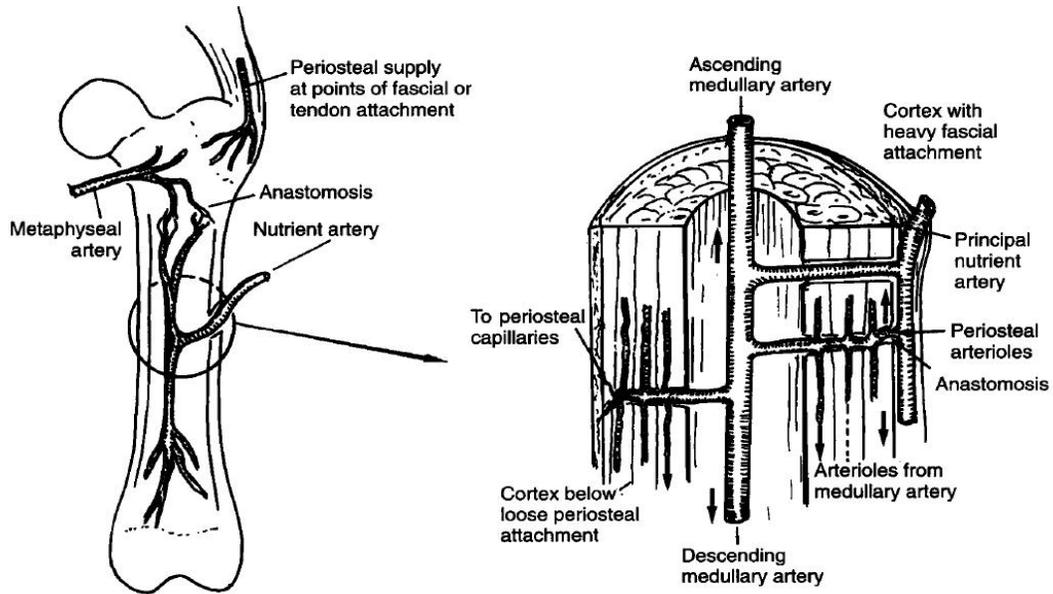


Figura 2. Esquema do suprimento sanguíneo de um osso longo maduro. (Tomado de Denny e Butterworth, 2000).

Durante a vida o osso cresce, modifica a sua forma, se regenera e sofre constante remodelação. No adulto, a formação e a reabsorção óssea mobilizam e rearmazena o cálcio e o fósforo dos ossos, sendo que o equilíbrio entre essas atividades ao longo do tempo irá determinar a massa óssea. Esses processos são mediados por eventos mecânicos, hormonais e fisiológicos (McDowell, 1992; Doblaré *et al.* 2004). Dentre os fatores que promovem o processo de reabsorção óssea está principalmente a remoção de tecido necrosado, mas também, processos prolongados de estresse biomecânico, desequilíbrios nutricionais como deficiência de vitaminas e/ou minerais como o cálcio, diminuição ou ausência de atividade física e mudanças na secreção de hormônios (Samuelson, 2007).

Quando lesado, o tecido ósseo, diferente de outros órgãos, pode-se regenerar, de forma que após a remodelação volta para seu estado fisiológico normal (forma e função). Esse complexo processo que envolve a interação de diversos mecanismos está sujeito a uma ampla possibilidade de variações e pode ser dividido em diferentes fases sequenciais que compreendem inflamação aguda, formação do hematoma, angiogênese, formação do calo, ossificação e remodelação (figura 3) (Webb e Tricker, 2000; Doblaré *et al.* 2004). A duração de cada fase e o tempo necessário para completar o processo de reparação tecidual depende de alguns fatores como a idade do paciente e estado de saúde geral, tipo, duração e intensidade do trauma, resposta inflamatória, suprimento sanguíneo local, redução, estabilização, carga e movimento (Schelling, 1991; Pinheiro e Gerbi, 2006).

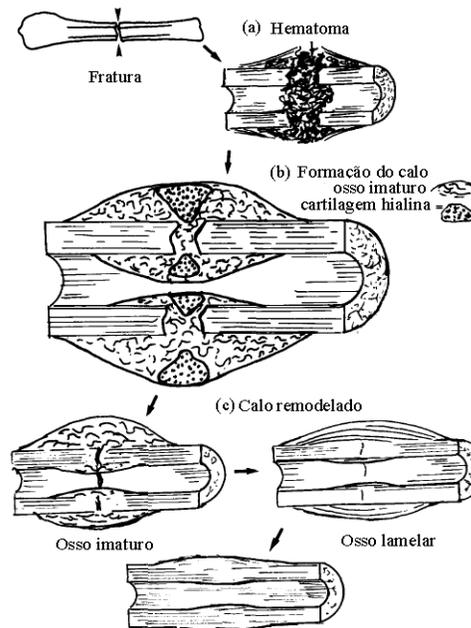


Figura 3. Ilustração esquemática da consolidação óssea secundária. (a) Formação do hematoma no sítio da fratura. (b) Substituição do hematoma por calo ósseo. (c) Processo de remodelação óssea. (Tomado de Denny e Butterworth, 2000).

Quando se produz uma fratura o perióstio é dilacerado, os vasos sanguíneos são rompidos, os fragmentos ósseos são deslocados e o tecido mole é traumatizado. Como consequência, ocorre sangramento local com subsequente formação do hematoma e interrupção do fluxo sanguíneo (Doige, 1990; Schelling, 1991).

São descritos dois tipos de consolidação óssea, primária e secundária, e a sua ocorrência depende fundamentalmente do grau de estabilidade presente no foco da fratura durante todo o processo de consolidação (Hungria, 2007; Schindeler *et*

al. 2008). Na consolidação primária, direta ou por primeira intenção, o osso é o único tecido formado entre os fragmentos ósseos; enquanto na consolidação secundária, indireta ou por segunda intenção, forma-se inicialmente um tecido conectivo cartilaginoso ou fibroso entre os fragmentos ósseos, chamado de calo, que irá se mineralizar e será substituído progressivamente por osso (Kaderly, 1991). A rigidez da fixação ou da imobilização da fratura determina o tamanho do calo cartilaginoso e conseqüentemente o tipo de consolidação (Schelling, 1991; An *et al.* 1999).

A consolidação primária depende de dois fatores básicos que são a vascularização local (biológico) e a estabilidade absoluta (mecânico) (Hungria, 2007). Este tipo de consolidação é observada geralmente nas reduções abertas com fixação interna rígida, onde há redução, estabilização e compressão do foco da fratura, com conseqüente eliminação do processo biológico de estabilização progressiva, sem formação dos tecidos de granulação, fibroso e cartilaginoso (figura 4) (Webb e Tricker, 2000; Hungria, 2007). Caracteriza-se pela ausência do calo periosteal e endosteal uma vez que aparentemente são eliminados os sinais biológicos responsáveis pelo recrutamento de células precursoras osteogênicas dos tecidos adjacentes (Kaderly, 1991). Entretanto, a grande maioria das fraturas sofre consolidação secundária, onde existe um discreto movimento dos fragmentos ósseos que são progressivamente estabilizados em função da restauração da circulação sanguínea local até a formação de tecido ósseo com recuperação da capacidade de carga (Hungria, 2007). Dispositivos de fixação de

fraturas como pinos intramedulares, reduzem, mas não impedem, o movimento dos fragmentos ósseos, o que estimula a invasão vascular e a formação do calo ósseo (Webb e Tricker, 2000).

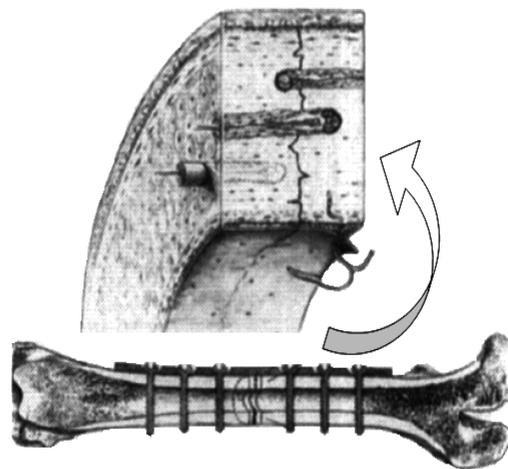


Figura 4. Desenho da ossificação primária apresentada nas fixações rígidas (tomado de Kaderly, 1991).

O processo de consolidação óssea secundária é um conjunto de respostas teciduais sequenciais. Imediatamente após a fratura, ocorre uma hemorragia local devido à ruptura de vasos periosteais, medulares e corticais presentes nos canais de Havers e de Wolkman, com conseqüente formação do coágulo e interrupção do fluxo sanguíneo local na tentativa de promover hemostasia. Conseqüentemente, a isquemia local causa necrose tecidual que é removida pelos macrófagos. Paralelo a este processo, ocorre reorganização do coágulo formando-se um tecido de granulação inicial pela migração e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas provenientes dos tecidos moles adjacentes, como também neoformação de pequenos vasos sanguíneos. Deste modo, forma-se o calo primário que

confere estabilização inicial à fratura (Webb e Tricker, 2000; Doblaré *et al.* 2004; Schindeler *et al.* 2008). É importante considerar que a proliferação vascular e o suprimento sanguíneo extraósseo persistem somente até o restabelecimento total do sistema vascular aferente (Schelling, 1991).

De modo geral, o calo cartilaginoso forma-se nos primeiros dias pós-trauma e divide-se em interno produzido pelo endósteo, e externo, considerado o mais importante, produzido pelo periósteo (Doige, 1990; Webb e Tricker, 2000). Na formação do calo ósseo, células mesenquimais aferentes do periósteo, endósteo e medula óssea, diferenciam-se em condrócitos, osteoblastos e fibroblastos. Os condrócitos proliferam e sintetizam matriz cartilaginosa até a completa substituição do tecido de granulação por cartilagem, enquanto os fibroblastos continuam sua proliferação. Paralelamente, se produz a invasão de células do endotélio vascular e inicia-se a angiogênese (Doblaré *et al.* 2004; Schindeler *et al.* 2008). Em seguida, inicia-se a formação de matriz óssea mineralizada que começa nas áreas de maior estabilidade na periferia do calo. Essa fase representa o período mais ativo da osteogênese e caracteriza-se por elevada atividade osteoblástica (Schindeler *et al.* 2008). O calo ósseo primário (cartilaginoso) é progressivamente substituído por calo ósseo secundário (mineralizado) formando uma ponte rígida ao redor do foco da fratura, conferindo maior resistência a mesma. O processo de remodelação, considerado a fase final e a mais longa do processo de consolidação óssea, consiste na reestruturação do osso imaturo na configuração original pela ação principalmente dos osteoclastos. Essa fase

começa lenta e progressivamente com o intuito de restabelecer a estrutura e função original do osso (figuras 3 e 5) (Doige, 1990; Schelling, 1991; Webb e Tricker, 2000; Doblaré *et al.* 2004; Samuelson, 2007). Embora as fases sequenciais de consolidação descrevam os eventos fundamentais ocorridos através do tempo de regeneração óssea, existe uma inter-relação entre eles, sendo que a substituição do calo por osso lamelar ocorre simultaneamente com a mineralização da cartilagem, invasão vascular e formação de osso imaturo. Além disso, eventos fundamentais como proliferação e diferenciação celular, síntese de matriz extracelular acontecem durante todas as fases de consolidação (Schindeler *et al.* 2008). Segundo Richardson (2000), devido ao metabolismo acelerado da espécie, as fraturas nos coelhos apresentam um calo ósseo por volta do décimo dia após o trauma, sendo que a consolidação óssea completa, em fraturas sem complicações, ocorre geralmente às seis semanas pós-trauma.

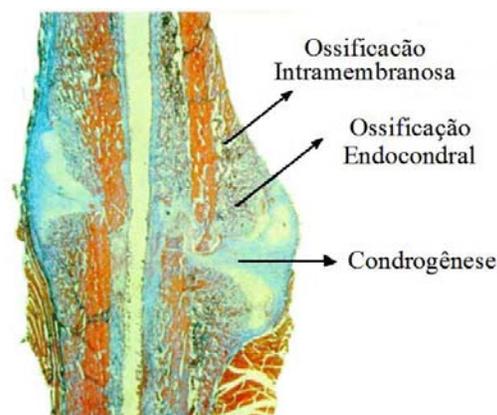


Figura 5. Representação gráfica da consolidação óssea secundária. Calo ósseo após nove dias da fratura mostrando osso maduro sob o periósteo (ossificação intramembranosa) e abundância de tecido cartilaginoso adjacente à fratura (condrogenese) (Fonte: Doblaré *et al.* 2004).

Diferentes espécies animais têm sido empregadas em pesquisas de consolidação de fraturas e osteotomias (An e Friedman, 1999, An *et al.* 1999). Apesar de todos os organismos apresentarem algumas diferenças na fisiologia óssea, Norris e colaboradores (2001) propuseram o coelho como modelo particularmente útil para se estudar a fisiologia óssea humana, uma vez que essa espécie apresenta padrões de crescimento ósseo e perfis de massa óssea semelhantes às dos seres humanos. O fechamento das placas epifisárias no coelho ocorre por volta das 28 semanas de idade e parece estar associado, como nos humanos, às concentrações de estrógenos no organismo (Harcourt-Brown, 2002). Além disso, a densidade mineral óssea continua aumentando até as 36 semanas de vida, oito semanas após a maturidade esquelética. Padrões de aumento de densidade óssea após o fechamento epifisário também são observados em humanos (Norris *et al.* 2001). Outra das vantagens é a semelhança do comportamento dos marcadores de remodelação óssea e a 1,25dihidroxitamina D. O metabolismo acelerado do coelho faz com que esses eventos fisiológicos aconteçam em períodos de tempo mais curtos do que nos humanos, fato que facilita e aprimora o estudo dos processos fisiológicos no tecido ósseo. Todavia, os autores alegam uma possível desvantagem do coelho, uma vez que a quantidade de Ca ingerida por kg de massa corporal é maior do que a registrada em humanos. Porém, isto também é observado com outros modelos animais (Norris *et al.* 2001).

Fotobiomodulação

Várias técnicas têm sido usadas na tentativa de melhorar a regeneração do tecido ósseo, dentre elas está a terapia com luz de baixa intensidade (<500mW de potência média), mais comumente conhecida como fotobiomodulação, a qual utiliza fontes de luz que parecem promover e/ou regularizar processos metabólicos que resultam em reparação de tecidos e alívio da dor (Bartels, 2002; Guzzardella *et al.* 2003). Entretanto, a fotobiomodulação está à margem das práticas aceitas nos aspectos não convencionais da medicina veterinária complementar e alternativa (Bartels, 2002).

Terapias fotobiomoduladoras têm sido testadas utilizando diferentes potências e densidades energéticas no tratamento de diversas patologias. Laserterapia de baixa energia (*Low-Level Laser Therapy* – LLLT) e diodos emissores de luz (*Light Emitting Diodes* – LED), utilizando espectros luminosos entre 630-1000nm, têm demonstrado, tanto em culturas celulares quanto em modelos experimentais, promover o processo de proliferação e diferenciação celular e reparação de tecidos como pele, tendões, ligamentos, ossos e cartilagem (Pöntinen *et al.* 1996; Whelan *et al.* 2001, Bartels, 2002; Corazza *et al.* 2007; Casalechi *et al.* 2008; Oliveira *et al.* 2008). Os autores supracitados, alegam que esse efeito parece ser conseguido através da estimulação de diversos processos biológicos como angiogênese, proliferação celular, quimiotaxia, síntese de colágeno, liberação de fatores de crescimento, dentre outros.

Evidências sugerem que a absorção da luz ocorre por meio de biomoléculas específicas presentes no tecido irradiado, que transformam a energia luminosa em energia

bioquímica (Karu 1999; Mikail, 2009). A irradiação celular em certos comprimentos de onda pode ativar alguns fotoreceptores presentes na célula (Karu, 1999). Desta forma, as reações bioquímicas específicas, bem como todo o metabolismo celular podem ser alterados. Estes fotoreceptores também chamados de cromóforos naturais são o citocromo das mitocôndrias, a hemoglobina, a bilirrubina, a mioglobina e a melanina, que quando estimulados dão início a vias secundárias de sinalização celular, resultando em aumento do metabolismo energético, modulação de funções celulares e consequente estímulo dos mecanismos de reparação celular (Desmet *et al.* 2006; Mikail, 2009).

Acredita-se que a sequência de eventos moleculares começa pela absorção da luz por fotoreceptores. Após absorção da luz, de certo comprimento de onda utilizado para a irradiação, esta molécula assume um estado eletronicamente excitado, a partir do qual processos moleculares primários podem levar a um efeito biológico mensurável em determinadas circunstâncias (Karu *et al.* 2005). Para ser considerado fotoreceptor e participar da fotobioregulação, esta molécula deve fazer parte de uma estrutura chave que regule uma via metabólica. Cadeias redox são um exemplo deste tipo de estrutura (Karu, 1999). Segundo Karu (1999), existem mecanismos de ação primários e secundários, porém, ainda não estão totalmente estabelecidos. Mecanismos primários ocorrem durante a irradiação atuando diretamente sobre as moléculas fotoreceptoras. Entretanto, sabe-se que muitas reações bioquímicas na célula ocorrem horas ou mesmo dias após irradiação, sendo conhecidas como reações secundárias (Karu, 1999).

Tem sido sugerido que as mitocôndrias são sensíveis à irradiação com fontes luminosas monocromáticas, as quais induzem ativação da cadeia respiratória na célula, produzindo mudanças no redox na mitocôndria e no citoplasma celular (Karu, 1999). Essas mudanças influenciam diretamente a permeabilidade celular, aumentando a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, afetando o fluxo de Ca^{++} que irá, de forma indireta, modular a síntese de DNA e RNA, com consequente modulação da proliferação celular (figura 6) (Karu, 1989; Karu *et al.*, 2005, Millis *et al.* 2005).

Esses mecanismos de bioestimulação, parecem ser induzidos por fontes luminosas no espectro visível e infravermelho próximo (400-1000nm) (Karu,1989) e diferem discretamente daqueles gerados por espectros de luz não visíveis (>1000nm), uma vez que a sequência de eventos parece ser iniciada ao nível da membrana celular, provavelmente através de efeitos fotofísicos nos canais de Ca^{++} e não na mitocôndria (Smith, 1991, Millis *et al.* 2005). Entretanto, sugere-se que independente do local onde for iniciado o estímulo, o resultado bioestimulante parece ser o mesmo: proliferação celular (figura 6) (Smith, 1991).

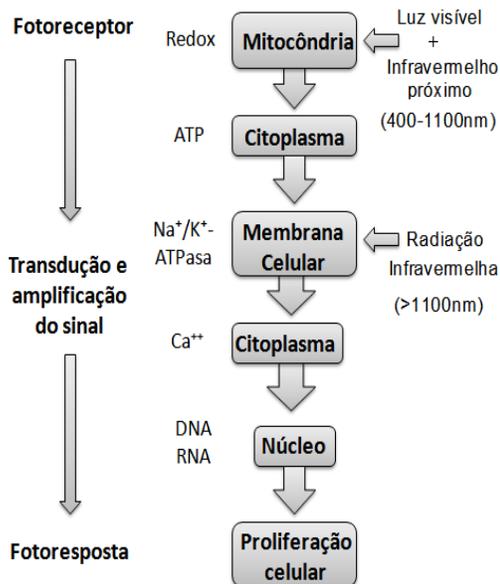


Figura 6. Esquema apresentando o modelo de estimulação biológica pela radiação *laser* de baixa energia (Tomado de Smith, 1991).

Uma das fontes fotobiomoduladoras utilizadas clinicamente são os diodos emissores de luz (*Light Emitting Diodes – LED*) que estão sendo introduzidos comercialmente como alternativa à laserterapia, uma vez que a irradiação com fontes de luz não coerente é mais econômico e parece ser tão eficiente quanto a irradiação por *laser* (Stahl *et al.* 2000; Enwemeka, 2006). Um LED é um componente eletrônico formado por materiais semicondutores, onde, por meio da movimentação de elétrons, é produzida a emissão espontânea de luz monocromática, não coerente, sem aumento de temperatura (Millis *et al.* 2005; Mikail, 2009).

O LED como fonte de luz apresenta diferença em relação ao *laser*. Uma dessas diferenças está na forma de gerar a luz, que no LED é tipicamente produzida por um mecanismo de emissão espontânea de

radiação e no *laser* a emissão de luz é estimulada por uma substância radioativa, como gases de hélio-neon (HeNe), arsenato de gálio ou arsenato de gálio-alumínio (GaAlAs) dentro outros (Millis *et al.* 2005). Desta distinção básica decorrem as diferenças estruturais e funcionais entre os dois dispositivos. Assim, três características principais diferenciam o tipo de luz decorrente de um dispositivo LED, daquele produzido pelo *laser* ou a luz comum: monocromático, não coerente e não colimado. Monocromático significa que toda a luz gerada pelo LED é de um único comprimento de onda e uma única cor. Colimação faz referência à distribuição dos raios e acontece quando todos os fótons caminham de forma paralela na mesma direção, como ocorre com o *laser* e não com o LED. Assim, no *laser*, o feixe de luz mantém o diâmetro desde a origem até o fim (não divergente). A coerência da luz refere-se à forma como os fótons viajam no espaço e no tempo, e ocorre quando se têm ondas de um mesmo comprimento que são encaminhadas de forma sincrônica, como ocorre com o *laser*. Esta característica ocorre em menor proporção com a luz gerada pelo LED e não acontece com a luz comum, onde diversas ondas são emitidas de forma assincrônica, cada uma com diferente frequência e comprimento de onda (figura 7) (Millis *et al.* 2005; Mikail, 2009).

A radiação emitida pelo LED pode ser definida como monocromática, não coerente, espontânea, sem emissão de calor e com divergência maior do que o *laser* (figura 7).

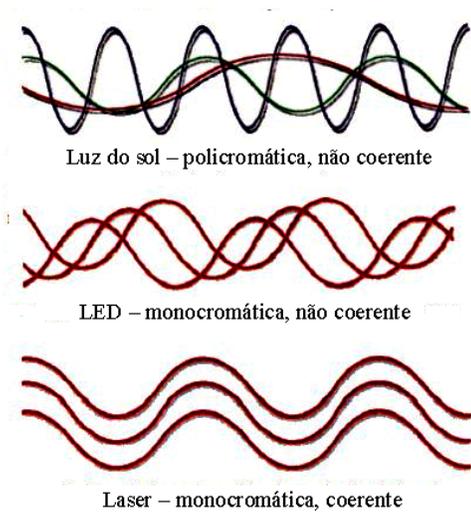


Figura 7. Desenho apresentando as principais diferenças entre a luz do sol, a luz do LED e a luz do *laser*.

De forma geral, a luz é dispersada e distribuída difusamente na medida em que penetra no tecido, fato que pode ser influenciado pela coerência da luz. Teoricamente, acredita-se que *laser*, LED e luz policromática não se dispersam nem se distribuem da mesma forma nos tecidos (Enwemeka, 2006). A penetração tecidual dos raios *laser*, usados nas terapias de baixa energia, tem sido definida em humanos e sabe-se que a coerência é diretamente proporcional à distribuição da luz nos tecidos: maior comprimento de onda, maior penetração (Millis *et al.* 2005; Mikail, 2009). Os autores atribuem os efeitos terapêuticos do *laser* a essa característica (Millis *et al.* 2005). Porém, evidências sugerem que não é esta propriedade física a responsável pelos efeitos anabólicos das fontes fotobiomoduladoras, uma vez que o LED demonstrou ser terapêuticamente tão eficiente quanto o *laser* no reparo tecidual (Whelan *et al.* 2001; Desmet *et al.* 2006). Smith (1991) alega que é a radiação a

responsável pelos efeitos fotobiológicos e/ou fotofísicos gerando respostas terapêuticas e não os dispositivos utilizados. Assim sendo, a distinção entre os dispositivos fotobiomoduladores, principalmente o LED e o *laser*, poderia ser feita pela coerência da luz propriamente dita e a coerência após interação biológica com os tecidos (Enwemeka, 2006). Fatores como a característica do tecido a ser irradiado deve ser levado em consideração, uma vez que o pelo e o tipo de pele parecem influenciar na penetração da luz (Millis *et al.* 2005).

O LED também difere do *laser* na quantidade de energia necessária para a geração da luz, sendo bem menor com o LED (Stahl *et al.* 2000). Ainda, o *laser*, devido à colimação da luz possui uma limitada largura do feixe, dificultando o tratamento de grandes áreas de tecido. Alguns tipos de *laser* emitem uma quantidade de calor que poderia, potencialmente, produzir ou aumentar o dano nos tecidos. Em contraste, o LED pode ser construído em diferentes tamanhos para alcançar grandes áreas de tecido e não emitem calor, tornando-os uma fonte luminosa simples, prática e econômica (Desmet *et al.* 2006).

Contudo, os mecanismos que levam aos efeitos fotobiomoduladores nos diferentes tecidos ainda não são bem entendidos, mas é consenso de que o efeito parece depender do momento da irradiação (Karu, 1989; Pinheiro e Gerbi, 2006), sendo aparentemente mais efetivo nas fases iniciais de maior proliferação celular (Vinck *et al.* 2003; Matsuzaka *et al.* 2004; Huang *et al.* 2007). Deve ser considerado que o tratamento com *laser* parece funcionar nos casos de danos teciduais graves ou em

estados patológicos (Karu, 1989; Smith, 1991; Brawn e Kwong-Hing, 2007).

Os efeitos fotobiomoduladores do LED nos tecidos e no metabolismo celular têm sido pesquisados *in vivo* (Vinck *et al.* 2005; Corazza *et al.* 2007) e *in vitro* (Vinck *et al.* 2003, Huang *et al.* 2007). *In vivo*, o LED tem sido utilizado no tratamento da dor e na reparação de tecidos com resultados satisfatórios (Whelan *et al.* 2001; Casalechi *et al.* 2008).

Vinck e colaboradores (2003) avaliaram a proliferação de fibroblastos *in vitro*, comparando diferentes tipos de LED com o *laser* e concluíram que tanto o LED quanto o *laser* induzem efeitos benéficos ao nível celular. Efeitos similares nos fibroblastos foram reportados por Huang e colaboradores (2007).

No tecido ósseo, a maioria dos pesquisadores tem empregado o *laser* como fonte biomoduladora, empregando diferentes espectros de luz, com comprimento de onda variando entre 630nm e 1000nm (Guzzardella *et al.* 2003; Khadra *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007, Lopes *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2008; Queiroga *et al.* 2008). Uma revisão de literatura recente de 34 artigos, com pesquisas conduzidas *in vitro* e *in vivo*, concluiu que a LLLT tem um efeito estimulante sobre o tecido ósseo. Esses estudos indicam que o uso de energia *laser* com comprimento de onda no infravermelho pode aumentar a proliferação de osteoblastos, deposição de colágeno e formação óssea (Pinheiro e Gerbi, 2006). Pesquisas com emprego do LED também têm sugerido respostas positivas à irradiação com este tipo de dispositivo (Liu *et al.* 2007; Kim *et al.* 2008).

Lithothamnium calcareum

Outras indicações para se promover a consolidação óssea é a utilização de nutracêuticos. O termo nutracêuticos é derivado das palavras nutrição e farmacêutico e são considerados alimentos ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo prevenção e/ou tratamento de doenças. Esses produtos incluem nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas, dietas, ervas, cereais e bebidas, dentre outros (Andlauer e Furst, 2002).

A nutrição, assim como a imunidade, tem uma intrínseca relação na recuperação pós-trauma. Na regeneração tecidual torna-se fundamental a instituição de um plano nutricional com dieta balanceada e ingestão adequada de calorias, uma vez que os nutrientes ingeridos somente serão utilizados para essas funções metabólicas, quando satisfeita a demanda para a manutenção normal do organismo (Hazewinkel, 1994; Reusch, 2005; Morais e Burgos, 2007). A nutrição é um fator importante no desenvolvimento e manutenção da massa óssea (Ilich e Kerstetter, 2000). Sabe-se que alguns minerais, como o Ca e o P, são essenciais para a saúde e produtividade dos animais e possuem funções nutricionais e bioquímicas bem definidas como manutenção do equilíbrio ácido-básico, da pressão osmótica, da permeabilidade das membranas celulares, contração muscular e coagulação, dentre outras; além disso, são componentes estruturais dos tecidos ósseo e muscular (McDowell, 1992; Mateos e Blas, 1998; Committee... *et al.* 2005).

Minerais considerados essenciais, necessários em quantidades relativamente

grandes (>100ppm), são classificados como macrominerais e aqueles necessários em pequenas quantidades (<100ppm) são classificados como microminerais. Consideram-se macrominerais o cálcio, fósforo, potássio, magnésio, sódio, cloro e enxofre; enquanto o cobre, cromo, cobalto, iodo, manganês, molibdênio, níquel, flúor, ferro, lítio, selênio, zinco são microminerais (McDowell, 1992, Ilich e Kerstetter, 2000).

A importância da suplementação com Ca sobre o desenvolvimento, qualidade e massa óssea permanece controverso (Norris *et al.* 2001, Doetsch *et al.* 2004). Porém, sabe-se que as necessidades dietéticas variam nas diferentes faixas etárias, sendo maiores nos períodos de crescimento, lactação e envelhecimento (Melillo, 2007; Morais e Burgos, 2007). O valor de um alimento como fonte de minerais depende não somente do seu conteúdo, mas também da quantidade que o animal poderá extrair e reter para seu próprio uso (Orsine *et al.* 1989), fato este relacionado à solubilidade da fonte mineral (Melo *et al.* 2006).

Diferentes eventos concomitantes concorrem para a manutenção do Ca pelo organismo, como capacidade de absorção intestinal, metabolismo ósseo, excreção renal e ingestão de vitamina D, elemento necessário para obtenção dos benefícios nutricionais do Ca (Morais e Burgos, 2007). Nos coelhos, o Ca é importante tanto para a qualidade dos ossos quanto para a qualidade dos dentes (Richardson, 2000). Segundo Harcourt-Brown (2002), uma má qualidade óssea e dental devido à deficiência de Ca pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento de má oclusão nos coelhos.

A consolidação de fraturas é um processo regenerativo que pode ser influenciado diretamente pela dieta e mais especificamente por aquelas com deficiência mineral (Hazewinkel, 1994). Desta forma, esperar-se-ia que a suplementação mineral, direta ou indiretamente, auxiliasse na consolidação óssea. Porém, pesquisas conduzidas com nutracêuticos no reparo ou prevenção de fraturas ainda apresentam resultados inconsistentes (Doetsch *et al.* 2004, Neumann *et al.* 2004).

Dentre os produtos considerados nutracêuticos está o *Lithothamnium calcareum*, uma alga coralina vermelha que precipita carbonato de Ca e magnésio em suas paredes celulares, sob a forma de cristais de calcita (figura 8) (Lopez-Benito, 1963; Dias, 2001). As algas marinhas vêm sendo utilizadas desde a antiguidade para uso agrícola e mais recentemente na nutrição animal, sendo incluída nas dietas em forma de farinha no momento da fabricação, geralmente substituindo o calcário (Dias, 2001). Apenas as formas livres das algas (rodolitos, nódulos e seus fragmentos) são viáveis para a exploração econômica, uma vez que constituem depósitos sedimentares inconsolidados, facilmente coletados através de dragagem (Dias, 2001).



Figura 8. Imagem fotográfica do *Lithothamnium calcareum* na forma morta (Tomado de Melo e Moura, 2009)

A composição do *Lithotamnium calcareum* consta basicamente de carbonato de Ca, carbonato de magnésio e mais de 20 oligoelementos, presentes em quantidades variáveis, principalmente ferro, magnésio, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio e estrôncio (Tabela 1) (Dias, 2001).

É utilizado na agricultura (Lopez-Benito, 1963), mas também nas indústrias de cosméticos, dietética, implantes em cirurgia óssea, potabilização de águas e nutrição animal (Dias, 2001; Melo *et al.* 2006; Pelícia *et al.* 2007; Melo *et al.* 2008, Teixeira, 2008).

Tabela 1 Composição mineral do Suminal®

Elemento Químico	%	Elemento Químico	%
Cálcio (CaO)	45,5	Lítio(Li)	5 ppm
Magnésio (MgO)	3,8	Flúor (F)	800 ppm
Silício (SiO ₂)	2,1	Bismuto (Bi)	8 ppm
Boro (B)	20 ppm	Prata (Ag)	< 1 ppm
Cobre (Cu)	2 ppm	Alumínio (Al)	0,7 %
Enxofre (S)	0,50	Bário (Ba)	5 ppm
Ferro (Fe ₂ O ₃)	0,71	Berílio (Be)	<1 ppm
Manganês (Mn)	46 ppm	Escândio (Sc)	1 ppm
Molibdênio (Mo)	5 ppm	Titânio (Ti)	0,01 %
Zinco (Zn)	11 ppm	Estanho (Sn)	10 ppm
Cromo (Cr)	4 ppm	Tungstênio (W)	<10 ppm
Cobalto (Co)	8 ppm	Ítrio (Y)	5 ppm
Cloro (Cl)	0,20	Zircônio (Zr)	5 ppm
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,11	Lantânio (La)	8 ppm
Potássio (K ₂ O)	0,02	Cério (Ce)	8 ppm
Sódio (Na)	0,25	Neodímio (Nd)	4 ppm
Vanádio (V)	14 ppm	Samário (Sm)	0,5 ppm
Níquel (Ni)	10 ppm	Európio (Eu)	0,5 ppm
Iodo (I)	12 ppm	Gadólínio (Gd)	0,05 ppm
Selênio (Se)	1 ppm	Disprósio (Dy)	0,3 ppm
Hólmio (Ho)	0,05 ppm	Érbio (Er)	0,1 ppm
Itérbio (Yb)	0,1 ppm	Lutécio (Lu)	0,01 ppm

Tomado de Melo e Moura, 2009

A sua utilização na alimentação animal foi avaliada em diferentes espécies melhorando a saúde dos animais, seu ciclo reprodutivo e a qualidade dos derivados (carne, leite, queijos e ovos) (Pope *et al.* 2002; Dean *et al.* 2003; Pelícia *et al.* 2007). O *L. calcareum* pode ser utilizado tanto no estado natural quanto após secagem e moagem (Algarea, 1997; Dias, 2001). O Ca na dieta para animais pode ser suprido por diferentes fontes deste mineral, tais como calcário,

fosfato de Ca, calcita, farinha de casca de ostras, casca de ovos, dentre outros (Pelícia *et al.* 2007). Melo e colaboradores (2008) citam que o *L. calcareum* pode ser usado como uma fonte alternativa de Ca em aves. Uma das vantagens do seu uso como fonte de Ca na dieta, quando comparado com outras fontes, é sua alta solubilidade, fator diretamente relacionado à absorção intestinal e à biodisponibilidade do produto (Airhart *et al.* 2002; Melo *et al.* 2006).

Em coelhos, foi observado recentemente que a inclusão do *L. calcareum* na dieta, em níveis de 0,25%, 0,50% e 0,75%, não mostrou melhoria no rendimento produtivo, rendimento de carcaça, na digestibilidade aparente de matéria seca, proteína e energia e na morfometria das vilosidades ileais (Euler, 2009). Entretanto, níveis de inclusão de 0,10% na dieta afetaram negativamente a largura e o comprimento das vilosidades do íleo (Euler, 2009).

São escassos os trabalhos sobre os efeitos do *Lithothamnium sp* no tecido ósseo, quando empregado em situações normais ou patológicas. Em estudo com ratos, Assoumani (1997) relatou que a farinha de algas apresentou vantagens em relação ao calcário no crescimento do osso fêmur e na biodisponibilidade de Ca. Resultados semelhantes sobre o crescimento dos animais foram relatados por Pope e colaboradores (2002).

Recentemente, foi observado o efeito da suplementação com o *L. calcareum* na consolidação de falha óssea cortical reconstruída com autoenxerto cortical na tíbia de cães, que mostrou precocidade no processo de consolidação, uma vez que a análise radiográfica indicou maior radiopacidade nos animais tratados quando comparados com os animais do grupo controle (Teixeira, 2008). Também, em relato de caso, foi observada consolidação satisfatória de fratura ulnar em equino tratado conservativamente com arnica e *L. calcareum* durante 30 dias (Palhares *et al.* 2008).

Metabolismo do cálcio em coelhos

O cálcio (Ca) constitui o componente principal do esqueleto. No coelho, 99% do Ca do corpo está nos ossos e nos dentes, que diferentemente de outras espécies, apresenta erupção permanente de aproximadamente 2mm por semana, representando um fator importante nas necessidades de Ca nesta espécie. O 1% restante do Ca total no corpo participa de funções metabólicas que incluem condução de impulsos nervosos, contração muscular, coagulação e equilíbrio eletrolítico (Blas e Mateos, 1998, Harcourt-Brown, 2002).

No sangue, o Ca encontra-se sob três formas: ionizado, unido a outros elementos (especialmente fosfato) ou unido a proteínas (especialmente albumina) (Harcourt-Brown, 2002). As necessidades dietéticas variam segundo os estágios da vida, sendo maiores durante o crescimento, gestação/lactação e envelhecimento (Melillo, 2007; Morais e Burgos, 2007).

A maioria dos mamíferos segue um padrão semelhante de metabolismo do Ca segundo as necessidades metabólicas. Dois hormônios, paratormônio (PTH) e calcitonina, atuam em conjunto para controlar e manter os níveis de Ca no sangue ótimamente equilibrados. O PTH é produzido pelas glândulas paratireóides quando o nível de Ca no sangue encontra-se abaixo do nível mínimo. Este aumento de PTH no sangue estimula a atividade da alfa-hidroxiase nas células dos túbulos renais, a qual aumenta a síntese de 1,25-dihydroxycholecalciferol (calcitriol), forma ativa da vitamina D. Conseqüentemente, o aumento de calcitriol, incrementa a absorção intestinal de Ca e P e em decorrência

elevam-se os níveis destes íons no sangue. Para se proteger contra níveis excessivos de Ca no sangue, as glândulas tireóides produzem calcitonina, que promove a absorção deste excesso de Ca e sua deposição nos ossos (Redrobe, 2006).

Os coelhos, entretanto, não mantêm a homeostase do Ca de maneira convencional, e não é claro por que apresentam tão elevados níveis de Ca sanguíneo quando comparados com outras espécies. Sabe-se que os coelhos metabolizam o Ca de forma diferente de todos os outros animais, onde a maior parte deste mineral na dieta é absorvida no intestino, independente das necessidades metabólicas, sendo o excesso excretado principalmente na urina através dos rins (Mateos e Blas, 1998; Melillo, 2007). Os níveis de Ca no sangue, portanto, variam substancialmente com o teor de Ca da dieta, sugerindo que a calcitonina não age da mesma forma sobre o excesso de Ca nesta espécie (Redrobe, 2006). Porém, existe controvérsia sobre esta hipótese (Mateos e Blas, 1998, Harcourt-Brown, 2002). Segundo Melillo (2007), a vitamina D não é importante na absorção do Ca quando os níveis na dieta são elevados, mas sim quando são deficientes. O autor ainda esclarece que o PTH, como em outras espécies, regula os níveis sanguíneos de Ca, porém, em maiores proporções, o que explica as altas concentrações no sangue.

Diferentemente de outros mamíferos, as concentrações de Ca no sangue dos coelhos variam amplamente (Melillo, 2007; Emanuelli *et al.*, 2008; Kaneko *et al.* 2008). Desta forma, o Ca no soro é proporcional à ingestão deste na dieta. Os coelhos apresentam praticamente completa absorção intestinal de Ca e como resultado, as

concentrações tanto de Ca ionizados quanto de Ca total no soro, são 30-50% maiores em comparação com aquelas em outras espécies de mamíferos (Ca ionizado, $3,4 \pm 0,26 \text{ mEq/L}$; Ca total, $12,92 \pm 1,0 \text{ mg/dL}$) (Harcourt-Brown, 2002).

Além dos níveis de Ca serem significativamente maiores no sangue do coelho, a forma como é absorvido desde o intestino até sua eliminação através dos rins também difere das outras espécies (Jenkins, 1997). O Ca pode ser absorvido desde o trato intestinal, diretamente por difusão passiva ou por transporte ativo através da mucosa, com a ajuda de proteína carregadora, ativada pelo calcitriol. O transporte passivo parece ser o mecanismo principal de absorção do Ca e depende do gradiente de concentração entre o lúmen intestinal e o sangue. A ausência de mecanismos hormonais compensatórios, explica o motivo da absorção do Ca ser proporcional à concentração deste mineral na dieta (Mateos e Blas, 1998; Harcourt-Brown, 2002). Nos coelhos, quando as concentrações de Ca na dieta são adequadas ou elevadas, a vitamina D parece não ser necessária para absorção do Ca, sendo neste caso, mediada pela difusão passiva. No entanto, nas dietas deficientes, a vitamina D aumenta a absorção intestinal deste mineral (Melillo, 2007).

A maioria dos mamíferos excreta o excesso de Ca de forma eficiente através da bile e intestinos. Entretanto, os coelhos filtram o excesso através dos rins, a uma taxa de 45-60% e excretam-no na urina, processo mediado pelo PTH e o calcitriol (Mateos e Blas, 1998; Melillo, 2007). As taxas de excreção de Ca, como a absorção, são proporcionais à ingestão alimentar. O Ca se

precipita como carbonato na urina alcalina dos coelhos. Isto, associado à ingestão de grandes quantidades de Ca, forma o sedimento urinário e confere o aspecto turvo à urina, típico desta espécie (Harcourt-Brown, 2002).

Outro mineral importante no organismo é o fósforo (P), uma vez que junto ao Ca compõe a estrutura dos ossos. Além disso, é regulador da formação óssea e inibidor da reabsorção e altas quantidades poderiam ser prejudiciais para o osso (Morais e Burgos, 2007). O P é obtido da dieta e sofre absorção intestinal devido à influência da vitamina D e o PTH (Harcourt-Brown, 2002). Segundo Moraes e Burgos (2007), a maioria do P vegetal é encontrado sob a forma de fitato que é de difícil digestão o que consequentemente dificulta a sua absorção. Nos coelhos, o PTH também estimula a excreção renal de P. Concentrações sanguíneas de P são difíceis de interpretar e são influenciadas por diferentes fatores como ingestão, níveis na dieta, absorção intestinal e/ou distúrbios metabólicos (Richardson, 2000). Segundo Harcourt-Brown (2002), existe escassa informação sobre a relevância clínica das concentrações séricas e urinárias de fosfato nos coelhos.

Cintilografia Óssea

Diferentes técnicas diagnósticas são usadas para avaliar o tecido ósseo. Uma delas é a cintilografia, que utiliza principalmente o tecnécio-99m como radiotraçador do tecido ósseo. Na medicina humana, a avaliação óssea com isótopos radioativos é um método rotineiramente usado no diagnóstico de distúrbios ósseos (Hughes, 1980).

Em 1937 na Universidade de Palermo (Itália), Carlo Perrier e Emilio Segrè descobriram o elemento 43 (Tecnécio – Tc), depois de estudar uma forte radioatividade emitida por uma placa de molibdênio (Mo) proveniente de um ciclotron (Schwochau, 2000). A maioria do ^{99}Tc é obtido como subproduto do decaimento radioativo do molibdênio-99 (Eckelman e Levenson, 1997; Schwochau, 2000, Saha, 2004).

O gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mais comum é um sistema fechado, composto por uma coluna cromatográfica de dióxido de alumínio (Al_2O_3), na qual é depositada uma quantidade conhecida de ^{99}Mo radioativo. Este desintegra-se na coluna e origina o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Fazendo-se passar através da coluna uma solução de cloreto de sódio estéril (NaCl 0,9%), coleta-se no líquido eluente somente o tecnécio-99m na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$), enquanto o ^{99}Mo permanece adsorvido à coluna de alumina (Saha, 2004). O Tc presente no $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ apresenta um estado de valência de +7. Neste estado, o tecnécio não pode-se ligar às moléculas dos quelantes empregados em estudos ósseos. Consequentemente, para tais estudos, torna-se necessária a redução do Tc+7 para estados de oxidação mais baixos, como +3, +4 ou +5, menos estáveis e capazes de se ligar aos agentes quelantes a fim de formar os radiofármacos (Eckelman e Levenson, 1997; Saha, 2004). Um dos agentes redutores do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ comumente utilizado é o íon estano (Sn^{2+}) (Eckelman e Levenson, 1997).

Segundo Saha (2004), mais de 80% dos radiofármacos usados na medicina nuclear, são marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, devido às características físicas e radioativas.

Especificamente, o ^{99m}Tc é o radioisótopo mais comumente utilizado na prática diagnóstica das patologias do tecido ósseo, por apresentar características desejáveis como meia-vida relativamente curta de seis horas, monoemissor de raios gama de baixa energia (140KeV), baixo custo, alta disponibilidade, dentre outras (Rocha e Harvert, 1979; Schwochau, 2000; Thrall e Ziessman, 2003). Este isótopo tem sido utilizado também para marcação de compostos, sendo os da família dos difosfonatos os traçadores de escolha na prática clínica, por possuírem um melhor clareamento sanguíneo e tecidual, já que não se ligam às proteínas (Hughes, 1980; Saha, 2004).

Para a preparação dos radiotraçadores ósseos é necessária a redução do ^{99m}Tc através da adição de cloreto estanoso (SnCl_2) em quantidade suficiente para reduzir o estado de oxidação do ^{99m}Tc de +7 (não reativo) para +4 (reativo), permitindo que ocorra a quelação mediante adição do radiotraçador (difosfonato). Desta forma, o ^{99m}Tc forma um quelato com o difosfonato na presença do SnCl_2 (Schwochau, 2000; Thrall e Ziessman, 2003).

Deve-se evitar a entrada de ar no frasco de marcação, uma vez que o oxigênio (O_2) hidrolisa o íon estanoso (Sn) gerando impurezas coloidais que alteram a biodistribuição do radiotraçador no corpo, reconhecidas pela captação no fígado ou no sistema reticuloendotelial degradando a imagem do esqueleto. Além disso, se o Sn for hidrolisado a eficiência de marcação é comprometida, resultando em pertecnetato livre, que também degrada a imagem. O radiotraçador deve ser usado num prazo

máximo de duas a três horas após o preparo (Thrall e Ziessman, 2003).

O comportamento químico instável do ^{99m}Tc ressalta a importância de avaliar a pureza radioquímica do produto, que é definida como a percentagem do total da radioatividade que se encontra na forma radioquímica desejada (Thrall e Ziessman, 2003). Por exemplo, se 5% da atividade de ^{99m}Tc permanece livre na forma de pertecnetato de sódio, pode-se dizer que a pureza radioquímica é de 95%. As causas das impurezas radioquímicas são a deficiente marcação inicial, radiólise, decomposição, mudança de pH, exposição à luz e/ou exposição de agentes quelantes ou redutores (Thrall e Ziessman, 2003).

Os radiotraçadores ósseos, como o metilendifosfonato marcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc -MDP), são utilizados para o diagnóstico de fraturas, tumores ósseos, lesões metastáticas, sarcomas, artrite, osteomielite e outras doenças ósseas, assim como para avaliação de osteointegração (Schwochau, 2000, Rijk, 2003; Zhou *et al.* 2008). A dose a ser administrada nos pacientes deve ser medida no calibrador de doses e pode ter uma variação de aproximadamente 10% do valor calculado (Thrall e Ziessman, 2003). As unidades de radioatividade expressam o decaimento ou a taxa de desintegrações do radiotraçador (tabela 2) (Thrall e Ziessman, 2003).

Após injeção intravenosa, estes radiotraçadores distribuem-se rapidamente pelos fluidos do espaço extracelular, sendo que 50% da dose injetada é fixada pelo osso 2–6 horas após administração (Bahk, 2000). Vinte e quatro horas após injeção, 75-85% do ^{99m}Tc -MDP são eliminados principalmente por excreção urinária (Figura 9) (Saha, 2004).

Tabela 2. Sistema internacional de conversão e unidades convencionais de radioatividade

UNIDADE CONVENCIONAL	
1 curie (Ci)	= $3,7 \times 10^{10}$ dps*
UNIDADES DO SISTEMA INTERNACIONAL	
1 becquerel (Bq)	= 1 dps
CURIES – BECQUERELS	
1 Ci	= $3,7 \times 10^{10}$ dps = 37 GBq
1 mCi	= $3,7 \times 10^7$ dps = 37 MBq
1 μCi	= $3,7 \times 10^4$ dps = 37 KBq
BECQUERELS – CURIES	
1 Bq	= 1 dps = $2,7 \times 10^{-11}$ Ci = 27 pCi
1 MBq	= 10^6 dps = $2,7 \times 10^{-5}$ Ci = 0,027 mCi
1 GBq	= 10^9 dps = 27 mCi

*dps: desintegrações por segundo.
(Tomado de Thrall e Ziessman, 2003)

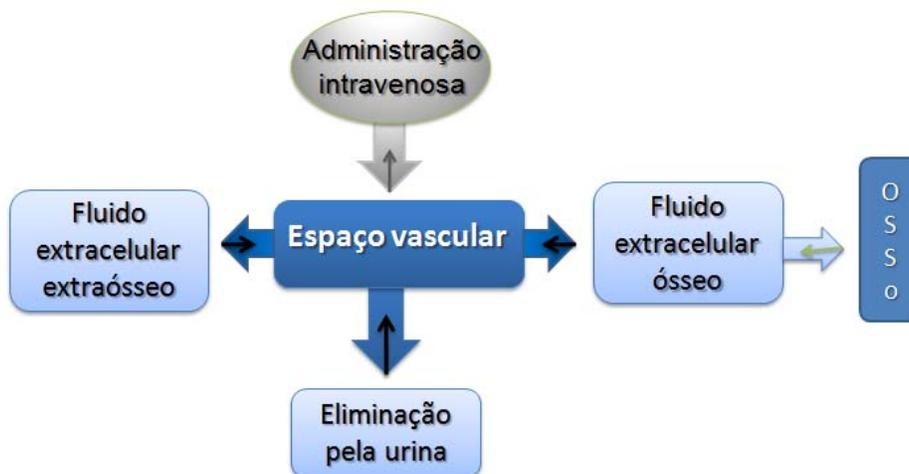


Figura 9. Desenho esquemático apresentando a distribuição do radiotraçador no corpo após administração intravenosa.

A identificação do esqueleto/tecido extraósseo melhora com o tempo. Assim sendo, a aquisição das imagens na fase estática da cintilografia óssea deve ser iniciada 2–3 horas após administração do

radiotraçador (Schwochau, 2000, Thrall e Ziessman, 2003). Após este tempo a maior parte do ^{99m}Tc já sofreu adequada depuração do tecido mole, restando na circulação aproximadamente 3-5% da dose

administrada, o que permite uma melhor observação do tecido ósseo (Rocha e Harvert, 1979; Saha, 2004).

O mecanismo de captação dos compostos de fósforo marcados com ^{99m}Tc é pouco compreendido (Thrall e Ziessman, 2003). Fatores inerentes ao osso como atividade metabólica, fluxo sanguíneo e conteúdo de Ca, assim como taxa de permeabilidade e coeficiente de difusão do radiotraçador, influem na captação deste pelo osso (Matin, 1979; Hoghes, 1980; Shani *et al.* 1990; Bahk, 2000). Parece que a absorção dos radiotraçadores no osso cortical é por difusão passiva e a sua distribuição está relacionada à disposição vascular e à natureza do osso (Hughes, 1980). Sugere-se que o $^{99m}\text{Tc-MDP}$ é inicialmente adsorvido pela matriz mineral do osso, com pequena ligação à matriz orgânica (Shani *et al.* 1990; Schwochau, 2000; Thrall e Ziessman, 2003).

A cintilografia óssea trifásica é uma técnica especial de imagem usada para avaliar alterações do fluxo sanguíneo local e para distinguir entre algumas doenças como osteomielite, celulite, gota, fraturas, dentre outras (Saha, 2004). Essa distinção é clinicamente importante devido às implicações terapêuticas de cada patologia. Evidências indicam que o estudo trifásico do tecido ósseo, é superior ao estudo estático convencional (Nutton *et al.*, 1985). O procedimento é realizado em três fases: a primeira fase do exame é dinâmica, onde se identifica a fase arterial e venosa do fluxo sanguíneo, a segunda fase é quando o radiotraçador está no espaço vascular, também chamada de *pool* e a terceira fase corresponde à fixação óssea propriamente dita (Thrall e Ziessman, 2003).

A cintilografia óssea é uma técnica diagnóstica altamente sensível para detectar precocemente áreas de metabolismo alterado no esqueleto, áreas de remodelação óssea e depósitos metastáticos, ao contrario da imagem radiológica, que requer uma alteração de 30–50% na densidade óssea para poder ser detectada. Porém, é pouco específica (Thrall e Ziessman, 2003).

Tomografia Computadorizada

Com o avanço da tecnologia, mais métodos e ferramentas diagnósticas estão sendo disponibilizados para avaliação da densidade óssea nos animais. Diferentes métodos são utilizados para quantificar a densidade mineral nos ossos, como digitalização de imagens, dupla emissão de raios X (DXA – *Dual-energy X-ray Absorptiometry*), simples ou dupla emissão de fótons (SPA e DPA *Single/Dual-Energy Photon Absorptiometry*), tomografia computadorizada quantitativa (TCQ), dentre outros (Lopez-Ben *et al.* 2006; Adams, 2009). Na TC raios X passam através do objeto de estudo e a energia transmitida é registrada pelos detectores do equipamento para depois serem construídas imagens digitais que representam a anatomia interna dos indivíduos (Mirell, 1979). O princípio da reconstrução de imagens tomográficas, a partir da multiplicidade de leituras transmitidas, foi descrito por Oldendorf em 1961. Alguns anos depois aplicando o mesmo princípio geral, Hounsfield desenvolveu, independentemente, o primeiro sistema de uso médico (Mirell, 1979).

Os equipamentos utilizados para realização da TC têm evoluído significativamente desde a sua criação, oferecendo cada vez

mais vantagens tanto para os pacientes quanto para os clínicos (LeBlanc *et al.* 2007). Atualmente existem complexos equipamentos, providos de múltiplos detectores e um tubo de raios X que gira em torno do paciente enquanto este é transportado através do aparelho a uma velocidade constante predeterminada (Figura 10) (Lopez-Ben *et al.* 2006; Adams, 2009).

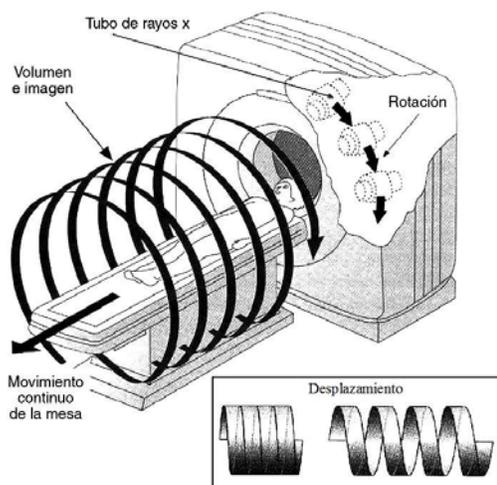


Figura 10. Esquema da aquisição helicoidal da imagem tomográfica e o distanciamento entre os cortes (Modificado de Muñiz e Casanovas, 2006).

Os raios X divergentes, emitidos de forma constante durante a passagem do paciente, são captados por vários detectores localizados no lado oposto (figura 11), o que possibilita a obtenção de vários cortes em uma única rotação, reduzindo drasticamente o tempo de aquisição das imagens (Muñiz e Casanovas, 2006). Além disso, a rotação em espiral permite a reconstrução dos cortes helicoidais de qualquer plano anatômico, em imagens volumétricas (3D), com alta precisão e definição (Lopez-Ben *et al.* 2006; LeBlanc *et al.* 2007; Adams, 2009). Isto é chamado de tomografia computadorizada helicoidal multicortes (HMCT – *helical multislice computed tomography*).

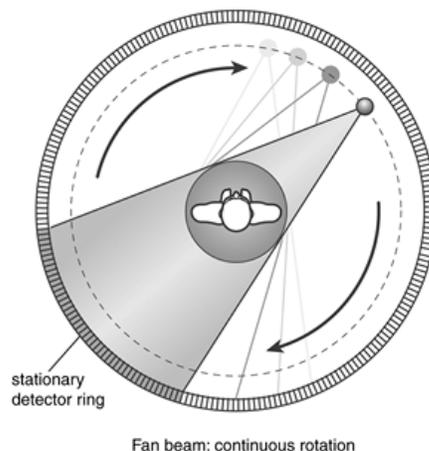


Figura 11. Esquema de um sistema de TC helicoidal multicortes apresentando a varredura do raio X colimado atravessando o corpo e sendo captado por vários detectores (Tomado de Lopez-Ben *et al.* 2006).

Os princípios de formação da imagem são semelhantes aos de um equipamento de radiografia convencional, baseados na magnitude de atenuação do feixe de raio X que passa através do corpo. Essa diferença de absorção determina as diferentes opacidades da imagem. A TC possui a habilidade de detectar e diferenciar uma ampla faixa de densidades teciduais, que representam os graus de atenuação relativa do feixe de raios X no momento em que atravessa o tecido, em comparação com atenuação da água. De modo geral, essas densidades, expressas em unidades *Hounsfield* (HU - *Hounsfield Units*), variam de -1000 até 4000, passando pelo zero que representa a água (An, 1999; LeBlanc *et al.* 2007). O intervalo desses valores e as unidades para cada tecido podem variar ligeiramente entre os fabricantes de escâner (Lopez-Ben *et al.* 2006).

A densidade óssea varia entre a cortical e a trabecular. O osso cortical possui valores

maiores que +1,000 UH, enquanto o osso trabecular está na faixa de -25 a 714 HU (An, 1999).

Uma das vantagens da TC com respeito a outras técnicas de diagnóstico por imagens, principalmente a radiografia convencional, é a capacidade de diferenciação, com alta definição, entre os tecidos moles e os duros. Também, deve-se destacar a possibilidade de avaliações detalhadas da anatomia, o que é muitas vezes impossível através de radiografias convencionais devido à superposição de imagens (LeBlanc *et al.* 2007). Para a avaliação do sistema musculoesquelético, meios de contraste intravenosos não são rotineiramente empregados. No entanto, estes podem ser particularmente úteis na avaliação de processos infecciosos ou tumorais em tecido muscular adjacente ao osso ou na avaliação da vascularização local por meio de angiogramas (Lopez-Ben *et al.* 2006).

Com respeito à densidade tecidual, especificamente do tecido ósseo, a TC quantitativa (TCQ) também apresenta vantagens quando comparada com outros métodos de densitometria óssea. A maior diferença está na possibilidade de se avaliar, de forma separada, a densidade das regiões cortical e medular do osso, fato particularmente útil na prática médica para avaliação de osteoporose e na odontologia para implantodontia oral (Lopez-Ben *et al.* 2006; Adams, 2009).

Histologia

O exame histológico é uma técnica diagnóstica utilizada para avaliação da estrutura e composição dos tecidos

biológicos. Apesar da existência de técnicas diagnósticas modernas, a histologia continua sendo uma importante ferramenta nas pesquisas ortopédicas (Gruber e Stasky, 1999). O processamento do tecido ósseo para a avaliação difere discretamente daquele realizado para tecidos moles, sendo necessário inicialmente a remoção do componente mineral do tecido por meio da descalcificação, feita geralmente em soluções ácidas, conservando a matriz orgânica e celular (Gruber e Stasky, 1999).

Fatores como tipo de corte (longitudinal ou transversal), espessura (μm) e coloração variam nos diferentes estudos e a sua escolha dependerá do interesse do pesquisador no momento da avaliação. Cortes de $5\mu\text{m}$ corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) são rotineiramente utilizados (Gruber e Stasky, 1999). Técnicas qualitativas e quantitativas de avaliação são comumente empregadas para estudar o tecido (Eurell e Van Sickle, 2006). O número de osteoblastos, o tamanho do osteoide, o grau de calcificação do osso novo e o número de osteoclastos são indicadores da formação ou reabsorção óssea (Thomas e Richter, 1984).

Anestesia em coelhos

Apesar da frequente utilização do coelho como modelo experimental, são relativamente escassas as pesquisas sobre anestesia nesta espécie e o índice de mortalidade devido a agentes sedativos e anestésicos é maior do que aquele registrado em cães e gatos (Brodbelt, 2009). Diferentes protocolos anestésicos são empregados em coelhos. Apesar da anestesia inalatória ser utilizada nesta espécie, são relatadas

dificuldades para sua administração, tanto através de máscara quanto por intubação endotraqueal (Mason, 1997; Harcourt-Brown, 2002; Percy e Barthold, 2007, Flecknell, 2009). Agentes injetáveis, sistêmicos e infiltrações locais, são também usados para anestesia em coelhos (Malinovsky *et al.* 1997; Malinovsky, 1999; Lipman *et al.* 2008).

Geralmente, preconiza-se jejum alimentar pré-anestésico na maioria das espécies animais para evitar complicações durante a anestesia (Rich, 2002). Para o coelho, entretanto, a literatura é controversa com relação à realização deste jejum (Lipman *et al.* 2008; Flecknell, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob o protocolo número 01/2009.

Foram utilizados 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, machos, de 4 a 5 meses de idade, com massa corporal média de 2,5Kg provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé - MG. Durante um período de adaptação de 30 dias, todos os

animais foram avaliados por exames clínico geral e laboratorial (hemograma) e submetidos a avaliações radiográfica e cintilografia óssea de controle, assim como mensuração dos níveis de cálcio (Ca) total, fósforo (P) e fosfatase alcalina (FA) no sangue e na urina. O período de adaptação é necessário para evitar que as alterações metabólicas e hormonais decorrentes do estresse do transporte e o novo ambiente interfiram nos resultados ou causem até mesmo a morte dos animais.

Os 20 animais foram distribuídos uniforme e aleatoriamente em quatro grupos experimentais (A, B, C, D) segundo o tratamento utilizado e foram mantidos em gaiolas individuais de arame galvanizado, medindo 60x60x37cm no Laboratório de Metabolismo Animal da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte, onde receberam ração formulada para o experimento e água à vontade.

As avaliações clínica e laboratorial das concentrações séricas e urinárias de Ca total, P e FA também foram realizadas durante todo o experimento (tabela 3)

A reparação óssea foi acompanhada por radiografia e cintilografia quinzenal e as avaliações de densitometria óssea e histologia foram feitas aos 60 dias de estudo (tabela 4).

Tabela 3. Tempos de realização das avaliações clínica e laboratorial.

Avaliação	Tempo de avaliação (dias do pós-operatório)								
	0	7	14	21	28	35	42	49	56
Clínica	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ca (soro, urina)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P (soro, urina)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FA (soro, urina)	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Ca: cálcio total, P: fósforo, FA: fosfatase alcalina

Tabela 4. Tempos de realização dos exames de radiografia, cintilografia óssea, densitometria óssea e histologia.

Exames	Tempo de avaliação (dias do pós-operatório)				
	0	15	30	45	60
Radiografia	X	X	X	X	X
Cintilografia óssea	X	X	X	X	X
Densitometria óssea					X
Histologia					X

Antes do procedimento cirúrgico não foi realizado jejum hídrico nem alimentar dos animais (Richardson, 2000; Lipman *et al.* 2008; Flecknell, 2009). No pré-operatório os coelhos receberam, pela via intravenosa, 30mg/kg de cefalotina¹ como antibiótico profilático 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. A anestesia foi induzida com injeção intramuscular, na região glútea, de 20mg/kg de cloridrato de cetamina² e 2,5mg/kg de cloridrato de xilazina³. Após a sedação do animal, foi feita tricotomia ampla do membro pélvico direito desde a região lombar até a articulação tíbio-társica. Anestesia epidural na região lombosacra, entre as vértebras L7 e S1, com injeção de 12,5mg/kg de bupivacaina⁴ foi realizada no animal antes de entrar à sala de cirurgia e para manutenção anestésica utilizou-se injeção intravenosa de propofol⁵ segundo a necessidade. Durante todo o período anestésico, foram monitoradas as frequências cardíaca e respiratória. Fluidoterapia de apoio foi feita com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Com o animal posicionado em decúbito lateral direito, foi realizada anti-sepsia com solução de iodopolivinilpirrolidona (PVPI)

degermante seguida por solução alcoólica de iodo a 2% desde a articulação coxo-femoral até a articulação tíbio-társica. Seguiu-se a colocação dos panos de campo.

No transoperatorio foi realizada abordagem do terço médio da tíbia do membro pélvico direito mediante incisão crânio-medial da pele, de aproximadamente 2,0cm de comprimento. Após secção da pele, o tecido subcutâneo e a fascia crural foram afastados⁶ e a tíbia foi exposta (Popesko *et al.* 1992, Piermattei, 1993). Com uma serra oscilatória acoplada à furadeira pneumática⁷ e sob irrigação constante com solução fisiológica a 0,9%, foi realizada a osteotomia transversal do terço médio da tíbia. Seguiu-se a osteossíntese mediante a inserção normógrada de dois pinos⁸ intramedulares utilizando-se perfurador manual⁹. O diâmetro dos pinos utilizados para cada animal foi determinado segundo o calibre do canal medular, variando segundo o diâmetro das tíbias. Assim, as combinações do diâmetro dos pinos utilizados foram dois pinos de 1,5mm, um pino de 1,5mm e um pino de 2,0mm ou dois pinos de 2mm. Após a coaptação dos fragmentos ósseos mediante utilização de duas pinças autocentrantes, os pinos foram introduzidos no ponto médio

¹ Cefamox; Bristol-Myers-Squibb, São Paulo

² Ketalar® 10%, Pfizer, São Paulo

³ Rompum® 2%, Bayer SA

⁴ Neocaina® 5%, Cristália

⁵ Propofol, Cristália

⁶ Afastadores de Homman

⁷ Furadeira pneumática 3M® 0 – 1100 rpm

⁸ Pinos de Steinmann

⁹ Jacob´s

entre a crista da tíbia e o ligamento colateral medial, orientados no eixo longitudinal até atingirem um ponto de maior resistência no terço distal da tíbia. Verificou-se a estabilidade do foco da osteotomia mediante discreta rotação externa e interna do membro. Uma vez estável, os pinos foram dobrados e cortados cerca de 0,5cm do osso com ajuda de um alicate articulado para cortar pinos (Figura 12). A fáscia crural e o tecido subcutâneo foram aproximados com fio absorvível de ácido poliglicólico¹⁰ 5-0 em padrão contínuo simples. A dermorrafia foi realizada por pontos separados simples com náilon monofilamentar¹¹ 5-0. Os animais foram radiografados imediatamente após a cirurgia.

No pós-operatório os animais foram avaliados clinicamente imediatamente após o procedimento e diariamente até a retirada dos pontos de pele oito dias depois da cirurgia, seguido de avaliação semanal até o final do experimento.

¹⁰ Safil®

¹¹ Fio inabsorvível - Ethicon

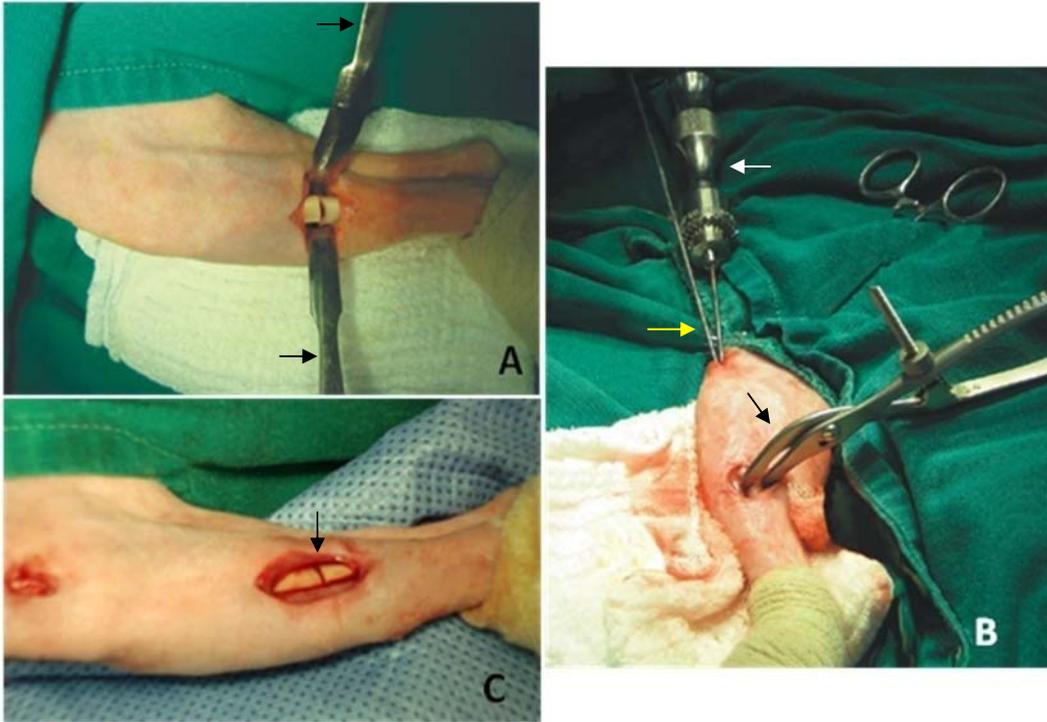


Figura 12. Imagens fotográficas apresentando os procedimentos cirúrgicos da osteotomia (A) Afastadores de Homman (setas) expondo os fragmentos ósseos após osteotomia do terço médio da tíbia, (B) Pinça autocentrante (seta preta) segurando o foco da osteotomia no terço médio da tíbia durante a introdução dos pinos intramedulares (seta amarela) com auxílio de perfurador manual (seta branca) (C) Coaptação dos fragmentos ósseos (seta) após a osteossíntese.

Formulação das dietas experimentais

A ração oferecida aos animais durante todo o período experimental foi fabricada na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé – MG. Foram formulados dois tipos de dieta experimental: uma dieta controle ou de referência, formulada segundo as recomendações de Blas e Mateos (1998) a fim de atender as exigências nutricionais de coelhos nesta faixa etária e uma dieta com nível de inclusão de 0,75% de farinha de algas marinhas (*Lithothamnium*

*calcareum*¹²) em substituição à Bentonita da dieta controle (Tabela 5). Os níveis de todos os demais nutrientes (carboidratos, proteínas, gordura e micronutrientes) foram mantidos iguais para as duas dietas (Tabelas 5 e 6). Os ingredientes utilizados para a fabricação de cada dieta foram rigorosamente pesados, misturados e peletizados, com grânulos de 12 – 15mm de comprimento por 4 – 5mm de diâmetro. As dietas foram oferecidas diariamente aos animais segundo o cálculo do consumo de 5% do peso do animal. Porém, foi oferecido 25% além do calculado para garantir a

¹² Suminal® – Algarea Mineração

disponibilidade constante de alimento. A ração era disponibilizada todos os dias no final da tarde, entre as 17 e 18 horas. Para a mensuração do consumo, as sobras do

alimento foram recolhidas e pesadas diariamente antes da administração da nova porção de alimento.

Tabela 5. Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dieta Controle	Dieta com <i>L.calcareum</i>
Feno de alfalfa	35,09	35,09
Farelo de trigo	25,00	25,00
Farelo de soja	10,53	10,53
Milho moído	6,69	6,69
Milho desintegrado com palha e sabugo	15,00	15,00
Óleo de soja	1,00	1,00
Fosfato bicálcico	0,57	0,57
Calcáreo	0,71	0,71
Sal	0,50	0,50
Bentonita	2,00	1,25
<i>Lithothamnium calcareum</i>	0,00	0,75
Melaço em pó	2,00	2,00
DL-metionina	0,11	0,11
L-lisina	0,30	0,30
Premix vitamínico e mineral ¹	0,50	0,50
Total	100,00	100,00

¹Premix de vitaminas e minerais da Vaccinar Ltda. Se (0,10mg); I(0,40mg); Fe(40,00mg); Cu(10,00mg); Mn(40,00mg); Zn(50,00mg); Vit.A(10.000UI); Vit.D₃(1.000UI); Vit.E(15,00mg); Vit.B₁₂(10,00mg); Vit.K(2,00mg); Tiamina(2,00mg); Rivo flavina(5,00mg); Piridoxina(3,00mg); Niacina(30,00mg); Ácido Pantotênico(15,00mg); Colina(500,00mg); Ácido Fólico(0,50mg).

Tabela 6. Valores calculados da composição nutricional das dietas experimentais

Ingredientes	Valor calculado (%)
Matéria seca	88,87
Proteína bruta	16,50
Fibra em detergente ácido	17,50
Cálcio	0,90
Fósforo total	0,60
Lisina total	0,74
Metionina + cisteína total	0,60
Energia digestível (Kcal)	2567,46

Grupos experimentais

Antes do procedimento cirúrgico os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em quatro

grupos experimentais (A, B, C, D) com cinco animais cada.

Os animais do grupo A receberam a dieta contendo o *L. calcareum*, os do grupo B receberam a mesma dieta associada ao tratamento com o LED, os animais do grupo C receberam somente o tratamento com LED e os animais do grupo D constituíram grupo controle e não receberam nenhum tipo de tratamento adicional à fixação da osteotomia (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos grupos experimentais

Grupo	Tratamentos	
	<i>Lithothamnium calcareum</i>	Fotobiomodulação (LED)
A	Sim	Não
B	Sim	Sim
C	Não	Sim
D	Não	Não

Para o tratamento com fotobiomodulação utilizou-se um aparelho LED¹³ de luz infravermelha com comprimento de onda de 880nm e potência de 50mW (figura 13). O protocolo de aplicação foi feito segundo as recomendações do fabricante e ajustado para a espécie como descrito por outros autores que utilizaram fontes fotobiomoduladoras no tecido ósseo (Liu *et al.* 2007). Os animais foram contidos manualmente e posicionados em decúbito dorsal com o membro pélvico direito esticado verticalmente. A ponta do aparelho foi colocada sobre a pele e foram irradiados quatro pontos consecutivos ao redor do foco da osteotomia (cranial, lateral, caudal e medial) (Figura 14). A ordem dos pontos para aplicação do LED foi respeitada em todos os animais para garantir a uniformidade na aplicação do tratamento. Cada ponto foi irradiado continuamente com uma densidade energética de 12J/cm² durante 120 segundos, sendo a dose final por animal de 48J/cm². Os animais receberam o tratamento imediatamente após o procedimento cirúrgico seguido de cinco sessões a cada 48 horas e cinco sessões a cada três dias, totalizando 11 sessões.



Figura 13. Imagem fotográfica do equipamento LED. Esquerda: aparelho FizioLed® da MMOptics; direita acima: óculos de proteção; direita abaixo: fonte de energia.



Figura 14. Imagem fotográfica mostrando o posicionamento do coelho e a forma de aplicação do LED na face cranial da tíbia direita sobre o foco da osteotomia.

O pelo da área irradiada foi tricotomizado periodicamente a fim de evitar uma possível interferência deste com a penetração da luz no tecido e para garantir a igualdade na aplicação do tratamento.

¹³ FizioLED® - M.M. Optics LTDA

Avaliação Clínica

A avaliação clínica dos animais foi feita por exame clínico geral com observação diária da ferida cirúrgica e da reação inflamatória até a retirada dos pontos oito dias após o procedimento cirúrgico, seguido de avaliação semanal do estado de saúde geral, estabilidade do foco da osteotomia e presença de claudicação. Todos os animais foram pesados semanalmente em balança de precisão, até o final do experimento.

Desempenho produtivo

A avaliação do desempenho produtivo foi realizada no laboratório de metabolismo animal da Escola de Veterinária da UFMG em Belo Horizonte, em ambiente apropriado para pesquisas metabólicas e de avaliação de alimentos em coelhos. A temperatura e umidade foram mantidas estáveis conforme as recomendações de infraestrutura propostas para esta espécie (Mateos e Blas, 1998; Harcourt-Brown, 2002).

As duas dietas, padrão e experimental, foram formuladas e oferecidas aos coelhos como descrito anteriormente, sendo avaliados o consumo de ração e os seus efeitos sobre o ganho de peso dos animais. O consumo diário de ração foi medido por meio da diferença entre a quantidade em gramas de ração fornecida e as sobras. O ganho de peso dos animais, medido semanalmente, foi obtido pela diferença entre o peso no início da semana e o peso no final da mesma.

Avaliação Radiográfica

As radiografias foram realizadas no setor de radiologia do Hospital Veterinário da UFMG.

Foram realizadas radiografias da tíbia do membro direito nas projeções crânio-caudal (CC) e médio-lateral (ML) dos animais de todos os grupos experimentais em diferentes tempos do pós-operatório (tabela 4). Os animais não receberam nenhum tipo de sedação para a realização do procedimento, sendo utilizada apenas a contenção manual. Foi usado equipamento radiográfico de 500mA e filmes¹⁴ para raio-X tamanho 24x30.

Foi feita avaliação duplo cego das radiografias por três avaliadores distintos que desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental de cada animal. Para isto, foi colocado em cada radiografia um número aleatório (101 – 200) e com o auxílio de um escore, foi qualificada a evolução do processo de consolidação óssea.

Para a análise, utilizou-se a média dos valores registrados. Reação periosteal, formação de calo ósseo, formação de ponte óssea, presença de linha de osteotomia e remodelação foram os parâmetros semi-quantitativos usados para a avaliação. Cada avaliador recebeu duas tabelas, uma delas com o escore junto às especificações de cada categoria (tabela 8) e a outra tabela com o código da radiografia onde era registrado o escore (An *et al.* 1999; Öztürk *et al.* 2008).

¹⁴ Kodak®

Tabela 8. Escore de avaliação radiográfica para consolidação de osteotomia experimental

Categoria	Escore	Especificações	
Reação periosteal	3	Exuberante	Ultrapassa os 60% do fragmento ósseo
	2	Moderado	Entre os 30 – 60% do fragmento ósseo
	1	Discreto	Menor a 30% do fragmento ósseo
	0	Ausente	Não existe reação
Formação de calo ósseo	3	Exuberante	Longitudinalmente ultrapassa os 60% do fragmento ósseo e/ou transversalmente é maior do que o diâmetro do osso
	2	Moderado	Longitudinalmente está entre os 30 – 60% do fragmento ósseo e/ou transversalmente está entre 50 – 100% do que o diâmetro do osso
	1	Discreto	Longitudinalmente é menor que os 30% do fragmento ósseo e/ou transversalmente é menor do que os 50% do diâmetro do osso
	0	Ausente	Não existe formação de calo ósseo
Formação de ponte óssea	3	União completa	O calo ósseo está completamente unido bilateralmente
	2	União moderada	Visão de linha radiolúcida parcial e pouco definida
	1	União discreta	Visão de linha radiolúcida pouco definida bilateralmente
	0	Não união	Visão nítida de linha radiolúcida bilateralmente
Presença de linha de osteotomia	3	Ausente	União completa do calo ósseo e das corticais
	2	Moderado	Ponte completa do calo ósseo com presença de linha de osteotomia nas corticais
	1	Discreto	União unilateral do calo ósseo sem união das corticais
	0	Completa	Não união do calo ósseo nem das corticais
Remodelação	4	Total	Ausência de calo ósseo
	3	Moderada avançada	Discreto calo ósseo com radiopacidade similar ao osso e/ou visibilização do canal medular
	2	Moderada inicial	Discreto calo ósseo com radiopacidade aumentada
	1	Discreta	Superfície do calo ósseo regular
	0	Ausente	Calo ósseo com superfície irregular
Total	16		

Avaliação Laboratorial

Após a desinfecção local com álcool 70%, foram colhidos de cada animal, 1mL de sangue com seringa hipodérmica de 3mL por punção do ramo lateral da veia safena. As amostras foram colocadas em tubos sem anticoagulante, devidamente identificados, e após 30 minutos da colheita o soro foi separado mediante centrifugação a 3000rpm por dez minutos. Quinhentos microlitros

(500µL) de soro foram colocados em tubos cônicos e armazenados em geladeira até o processamento. Usando um kit comercial¹⁵, foram quantificados o Ca total, o P e a FA pelo método colorimétrico segundo as recomendações do fabricante.

Colheram-se de cada animal 2mL de urina através de sonda uretral número quatro. Esta foi imediatamente encaminhada para o

¹⁵ Synermed International Inc.

laboratório onde foi centrifugada a 1000rpm durante cinco minutos para separação do sobrenadante. Foram colocados em tubos cônicos¹⁶ devidamente identificados, 500µL de sobrenadante. Devido à característica de elevada concentração da urina do coelho, as amostras foram diluídas em água estéril numa relação de 1:10 para a leitura. Utilizando um kit¹⁵ comercial foi realizada a dosagem de Ca total, P e FA segundo as recomendações do fabricante.

As amostras de sangue e de urina foram processadas e avaliadas no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG utilizando equipamento¹⁷ especializado.

Os resultados das análises bioquímicas foram lançados em mg/dL para Ca e P, e em UI/L para FA. Segundo o sistema internacional de unidades (SI – *International System of Units*), o Ca e o P são reportados em mmol/L (Kaneko *et al.* 2008). Desta forma, neste trabalho, os valores serão expressos em mmol/L após a conversão (tabela 9).

Tabela 9. Fatores de conversão de unidades

Parâmetro bioquímico	Unidade	Fator	Unidade Internacional (SI)
Cálcio	mg/dL	x 0,2495	mmol/L
Fósforo	g/dL	x 0,3229	mmol/L

Fonte: Kaneko *et al.* 2008

¹⁶ Eppendorf, 1ml

¹⁷ COBAS MIRA – R&M diagnóstico

Cintilografia Óssea

A consolidação da osteotomia foi acompanhada também por cintilografia óssea trifásica, realizada no departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, utilizando uma gamacâmara¹⁸ com colimador de baixa energia e alta resolução (Figura 15). Para a realização do exame, foi utilizado um fármaco (metilenodisfosfonato – MDP) marcado com material radioativo (^{99m}tecnécio) formando o radiotraçador Metilenodifosfonato¹⁹ (^{99m}Tc-MDP).

O procedimento de marcação foi realizado em uma câmara de chumbo por pessoa treinada, que encontrava-se devidamente paramentada com luvas de látex, avental de manga comprida e óculos blindados. O metilenodifosfonato²⁰ (MDP) foi misturado com o pertecnetato de sódio²¹ (Na^{99m}TcO₄) obtido da eluição do gerador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, variando segundo o peso do animal. Esta marcação era feita para uso exclusivo no dia, uma vez que o composto deve ser usado em um prazo máximo de 2-3 horas após o preparo. A dose era calculada antes da marcação segundo o peso dos animais.

Em um frasco ampola lacrado e a vácuo contendo MDP liofilizado e cloreto estanhoso (SnCl₂) como agente redutor, foi adicionado o pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄). A solução permanecia a temperatura ambiente por dez minutos para garantir a reação de marcação, obtida através

¹⁸ Nucline TH/22, Mediso (Medical Imaging System)

¹⁹ Laboratório de Radioisótopos, UFMG

²⁰ Laboratório de Radioisótopos, UFMG

²¹ ECOGRAF Núcleo diagnóstico – Medicina Nuclear – Belo Horizonte

da redução do ^{99m}Tc por ação do íon estanhoso, e a formação de um quelato entre o ^{99m}Tc reduzido e o MDP.

Antes de cada cintilografia era determinada a pureza radioquímica (PR) através de cromatografia em camada delgada (CCD), para determinar a presença de pertecnetato livre, sendo desejáveis índices com valores superiores a 90%. Para isto, foi utilizada uma lâmina de sílica gel de 1x10cm dividida em dez partes de um centímetro. No terceiro quadrante da lâmina (2,5cm), era aplicada uma gota do radiotraçador e ela era então colocada num tubo de ensaio, contendo acetona como solvente. Quando a acetona absorvida atingia a metade do décimo quadrante, a lâmina era retirada do tubo de ensaio, secada a temperatura ambiente e cortada em duas partes de cinco centímetros (superior e inferior). As partes eram colocadas em dois tubos de contagens e levadas para o contador de radiação²².



Figura 15. Imagem fotográfica da Gamacâmara Nucline TH/22. (A) Detector de radiação, colimador LEHR (seta). (B) computador de aquisição de imagens.

²² Contador de radiação gama 1480 Wizard® 3

O pertecnetato (tecnécio livre), considerado uma impureza gerada no processo de marcação, migra para a parte superior da CCD, enquanto o ^{99m}Tc -MDP e o ^{99m}Tc reduzido e hidrolisado permanecem na origem da lâmina de CCD (Figura 16).

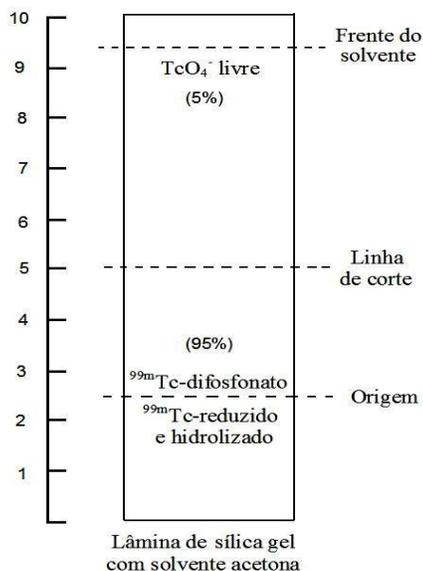


Figura 16. Representação esquemática do sistema de radiocromatografia para controle de qualidade do ^{99m}Tc -MDP.

A radioatividade das cromatografias foi contada em um calibrador de dose. A PR foi determinada da seguinte forma:

$$\% \text{MDP-}^{99m}\text{Tc} = \frac{100 \times \text{cpm inferior}}{\text{cpm superior} + \text{cpm inferior}}$$

Uma vez determinada a pureza radioquímica e previamente à realização do exame os animais foram pesados e preparados mediante colocação de cateter heparinizado na veia cefálica. Quinze minutos antes da

aplicação do radiotraçador, os animais foram anestesiados com associação de 20mg/kg de cloridrato de cetamina²³ e 2.5mg/kg de cloridrato de xilazina²⁴ injetados pela via IM e posicionados na gamacâmara²⁵. Foi utilizado um colimador²⁶ de baixa energia e alta resolução (LEHR – *Low Energy high Resolution*). O animal foi colocado sobre uma bandeja plástica em decúbito dorsal, com os membros pélvicos tracionados caudalmente e alinhados paralelamente, sendo que a área de captação do colimador atingia desde o terço médio do fêmur até os metatarsos (Figura 17). Cada animal recebeu uma dose de 1,6mCi/kg (59,2MBq) de ^{99m}Tc -MDP pela via intravenosa como sugerido por outros autores que utilizaram esta espécie (Rijk *et al.* 2003). Três segundos após aplicação do radiotraçador foi realizada a imagem na fase de fluxo, obtendo imagens dinâmicas de três segundos de duração durante 60 segundos (Figura 18 A e B). Cinco minutos após a aplicação, foi captada a fase tissular ou de equilíbrio (*pool*), que gera uma imagem estática captando, de forma constante, a radiação emitida durante 300 segundos (Figura 19 A e B). Seguiu-se a captação da imagem estática da fase de fixação óssea três horas depois da aplicação do radiotraçador, obtendo uma imagem da radiação emitida durante 600 segundos (Figura 20 A e B). Os tempos de aplicação do radiotraçador e de realização de cada fase foram registrados. A cintilografia foi realizada em diferentes tempos do pós-operatório (tabela 4).

²³ Ketalar® 10% - Pfizer, São Paulo

²⁴ Rompum® 5% - Bayer SA

²⁵ Nucline TH/22, Mediso (Medical Imaging System)

²⁶ Colimador de baixa energia LEHR

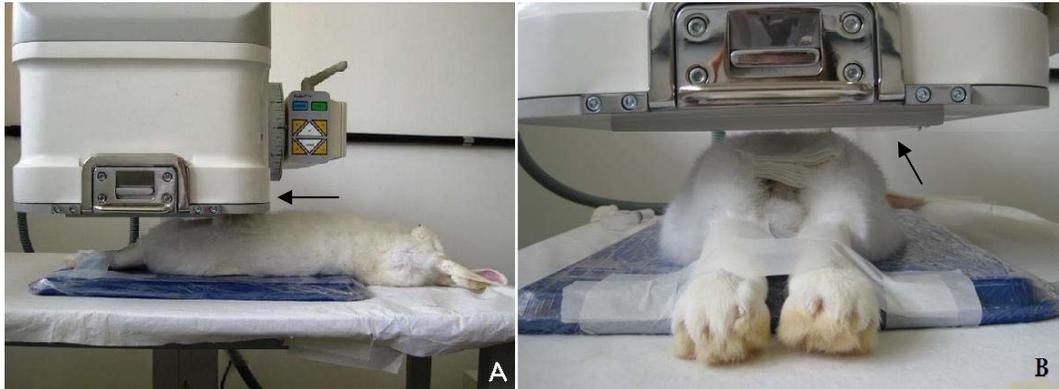


Figura 17. Imagem fotográfica apresentando o posicionamento do coelho na gamacâmara durante a cintilografia óssea. (A) vista lateral esquerda do coelho com o colimador (seta) na região pélvica, (B) vista posterior do coelho posicionado sob o colimador (seta).

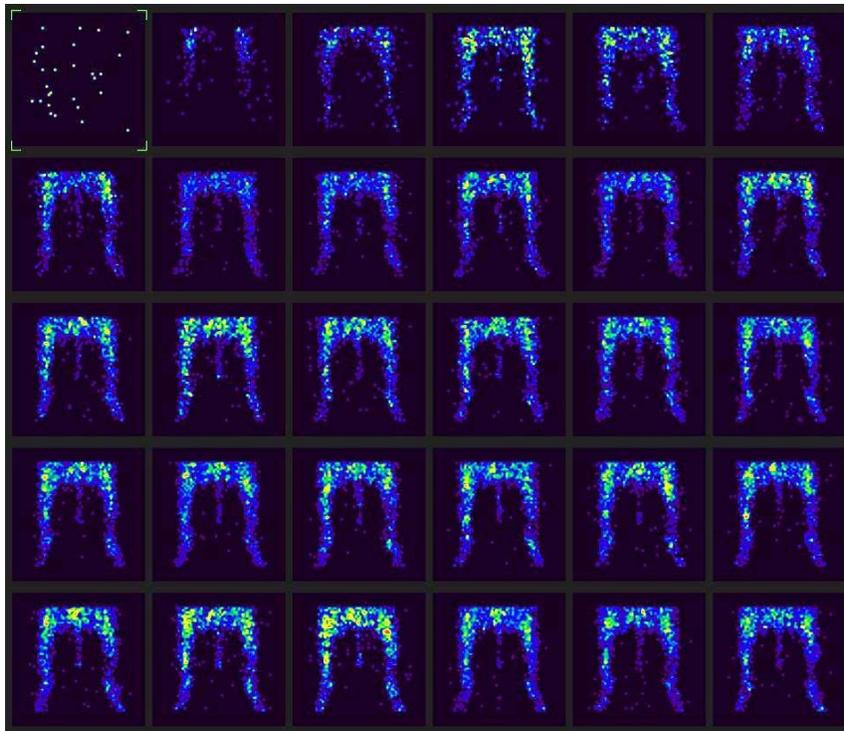


Figura 18. Imagem cintilografica da fase de fluxo apresentando, de esquerda para direita e de cima para baixo, a captação da radioatividade do ^{99m}Tc -MDP chegando progressivamente nos membros pélvicos, desde o fêmur até os metatarsos (vista ventro-dorsal).

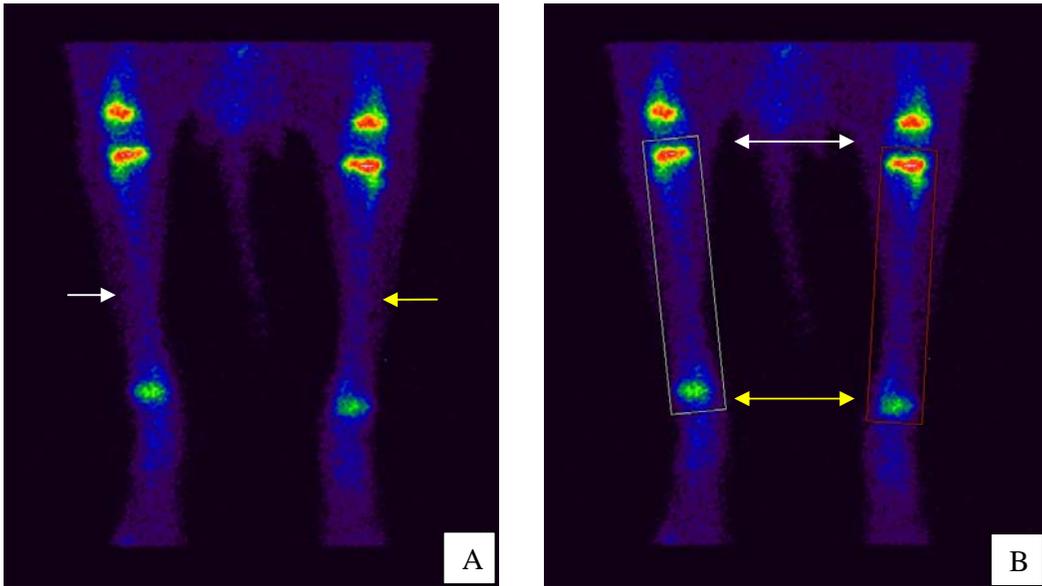


Figura 19. Imagem cintilográfica da fase tissular ou de equilíbrio. (A) captação da radioatividade do ^{99m}Tc -MDP nos membros pélvicos direito (seta branca) e esquerdo (seta amarela), desde o terço proximal do fêmur até os metatarsos, com a cauda entre eles (projeção ventro-dorsal) (B) imagem anterior apresentando a região de interesse (ROI), selecionada desde a articulação fêmoro-tíbio-patelar (seta branca) até a articulação tíbio-metatarsica (seta amarela) nos dois membros.

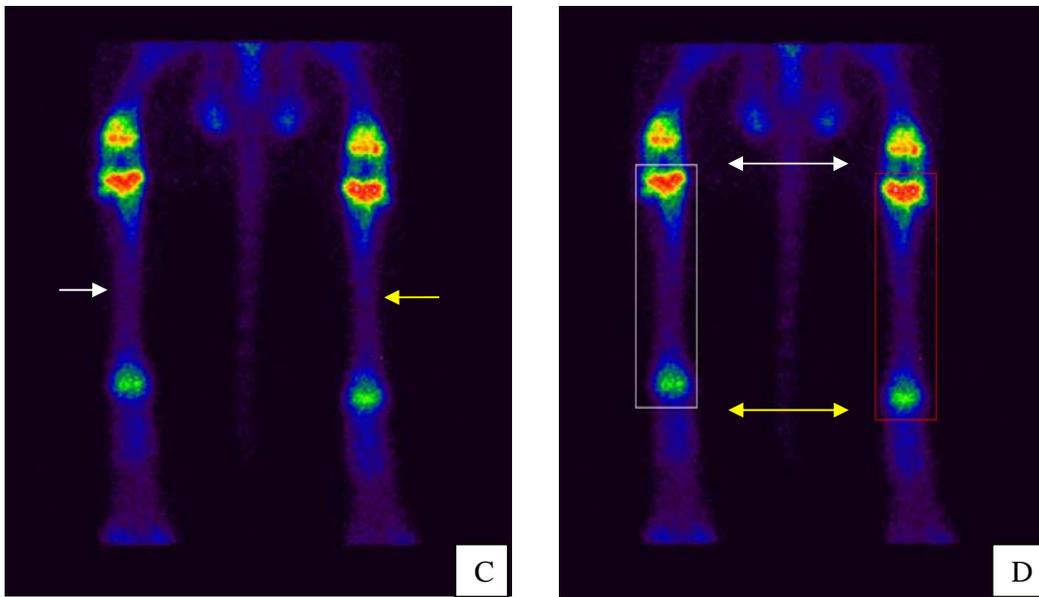


Figura 20. Imagem cintilográfica da fase estática de fixação óssea. (C) captação da radioatividade do ^{99m}Tc -MDP nos membros pélvicos direito (seta branca) e esquerdo (seta amarela), desde o terço proximal do fêmur até os metatarsos, com a cauda entre eles (projeção ventro-dorsal) (D) imagem anterior apresentando a região de interesse (ROI), selecionada desde a articulação fêmoro-tíbio-patelar (seta branca) até a articulação tíbio-metatarsica (seta amarela) nos dois membros.

As imagens das fases de fluxo, tissular e fixação óssea, foram processadas com auxílio de *software*²⁷ próprio do equipamento, onde cada pixel da imagem representou o número de captação de raios gama detectados no paciente. Para quantificar a radiação na região da osteotomia, foi selecionada uma área para mensuração da radiação emitida pelo tecido ósseo do membro operado que foi comparada com a mesma área do membro contralateral. Esta área foi denominada de região de interesse (ROI – *Region Of Interesting*). A ROI foi obtida manualmente delimitando o tamanho da tíbia, desde a articulação fêmoro-tíbio-patelar até a articulação tíbio-metatarsica de cada membro (Figuras 19B e 20D). Para garantir a igualdade das regiões delimitadas, o ROI selecionado no membro direito (alvo) foi copiado e colado sobre o membro esquerdo (não alvo), quando era realizada a contagem de radiação de cada um dos ROI. Em seguida, foi determinado o índice de atividade (IA), obtido do quociente da ROI do membro alvo pela ROI do membro não alvo, utilizando a seguinte fórmula:

$$IA = \frac{\text{ROI alvo}}{\text{ROI não alvo}}$$

Para avaliação da fase de fluxo de cada coelho foi calculado o IA, como descrito anteriormente, na vigésima imagem, que era selecionada a partir da chegada do radiotraçador nos membros pélvicos.

A avaliação das imagens foi feita por pessoa treinada, sendo um único avaliador que

²⁷ MEDISO InterView XP® v1.04.036 (Build 53)

desconhecia os tratamentos e os grupos experimentais. Comparação entre os dados obtidos nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias do pós-operatório dos animais e entre os grupos experimentais foram analisados estatisticamente.

Aos 60 dias do pós-operatório foi realizada eutanásia dos animais mediante injeção intravenosa de sobredose anestésica, utilizando 90mg/kg de tiopental sódico²⁸. Antes da eutanásia, foi canulada a veia safena com cateter²⁹ número 18G para sedação dos animais, mediante injeção IV lenta de 5mg/kg de cloridrato de xilazina³⁰. A necropsia dos animais foi realizada na Escola de Veterinária da UFMG. A tíbia do membro direito foi retirada mediante desarticulação ao nível das articulações fêmoro-tíbio-patelar e tíbio-metatarsica. A seguir, foi realizada dissecação cuidadosa do osso, retirando-se todos os tecidos moles, com o cuidado para não interferir no calo ósseo. As peças foram identificadas, fotografadas e colocadas em recipientes adequados com solução de formalina neutra 10% em tampão fosfato por 30 dias. Foram realizadas avaliações da densitometria óssea e histologia.

Densitometria Óssea

A densidade mineral óssea (DMO) foi determinada por tomografia computadorizada, realizada no laboratório Hermes Pardini do Hospital *Lifecenter*, utilizando um tomógrafo helicoidal³¹. Para

²⁸ Tiopentax® - Cristália

²⁹ BD Cateter Insyte™ – Becton Dickinson

³⁰ Rompum® Bayer SA

³¹ Multi Slice – 16 canais – Philips®

isto, foram cortados fragmentos ósseos da tíbia direita de 4cm de comprimento, atingindo a região da osteotomia e o osso adjacente à mesma. Os 20 fragmentos, devidamente identificados, foram afixados em uma placa de isopor com fio de sutura não absorvível³² 5-0 (figura 21) e transportados em formalina neutra 10% em tampão fosfato até o laboratório. O tamanho da placa foi de 10x15cm correspondente à área de leitura do tomógrafo.



Figura 21. Imagem fotográfica dos fragmentos ósseos afixados na placa de isopor para a realização da tomografia computadorizada.

Para realização do procedimento a placa de isopor contendo as amostras foi colocada no tomógrafo (120kV, 199mAs) e foram obtidos cortes helicoidais, com 1mm de espessura e 1mm de separação entre eles. Imediatamente após a realização do exame, as imagens foram processadas com auxílio de *software*³³ próprio do tomógrafo, onde foi mensurada a atenuação da radiação em uma área delimitada para cada amostra, denominada região de interesse (*Region of interesting* – ROI). O ROI, correspondente ao tamanho do fragmento ósseo, incluía as

duas corticais, a medular e o calo ósseo. Antes da seleção do ROI, era ajustada a espessura do corte para cada fragmento. Por fim, a área e a densidade tecidual média de cada amostra foram registradas em mm² e unidades *Hounsfield* (HU – *Hounsfield Units*) respectivamente (Figura 22).

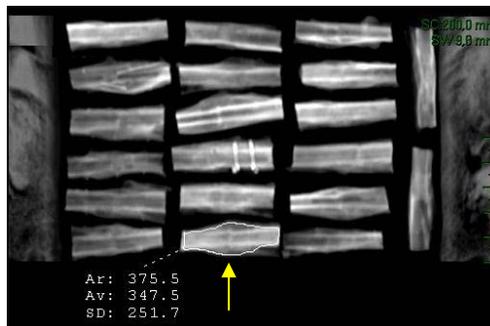


Figura 22. Imagem tomográfica digital apresentando a forma de seleção da região de interesse (ROI) (seta amarela).

O processamento e a análise dos dados obtidos foram realizados por um mesmo avaliador que desconhecia tanto os tratamentos quanto os grupos experimentais.

Imediatamente após a realização da tomografia computadorizada as amostras foram colocadas novamente em formalina neutra 10% em tampão fosfato e encaminhadas para o laboratório de histopatologia para realização do processamento histológico.

Histologia

O processamento das amostras foi realizado aos 60 dias do experimento, no Laboratório Clínico Cajal, em Belo Horizonte - MG.

Para realização da histologia os fragmentos ósseos de 4cm de diâmetro foram

³² Prolene – Ethicon®

³³ Brilliance®16

conservados em formalina neutra 10% em tampão fosfato durante 30 dias. Após esse período cada fragmento ósseo foi envolvido em gaze e identificado para descalcificação em solução de ácido fórmico 24%, tamponado com citrato de sódio, pH 4.5. As 20 amostras foram colocadas no mesmo recipiente e imersas na solução descalcificadora. A solução foi trocada a cada três dias até a comprovação radiográfica de completa descalcificação do tecido.

Após a descalcificação, as amostras foram lavadas por 24 horas em água corrente e cortadas longitudinalmente, para então serem desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, absoluto 1, absoluto 2), permanecendo duas horas em cada um deles. Posterior à desidratação, os fragmentos foram diafanizados em xilol por duas horas e embebidos em parafina líquida por duas horas e incluídos em blocos de parafina. Destes foram obtidos cortes de 5µm de espessura. As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) segundo

procedimento padrão para observação por microscopia óptica de luz.

A análise das amostras foi realizada no laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Histologia descritiva foi realizada nas amostras para observação da morfologia, estrutura e organização das células e da matriz extracelular, utilizando um escore de avaliação (tabela 10).

Foi realizada avaliação duplo cego das amostras. A análise semiquantitativa foi feita por três avaliadores distintos que desconheciam a distribuição dos tratamentos, com exceção do grupo controle que foi avaliado inicialmente e serviu de referência para classificar a consolidação nos outros grupos experimentais. Para isto, as lâminas foram marcadas aleatoriamente com um número (01 – 15) e com o auxílio de um escore, foi qualificada a consolidação óssea em termos de presença de calo ósseo e união óssea (tabela 10).

Tabela 10. Escore de avaliação histológica para consolidação de osteotomia experimental

Categoria	Escore	Descrição
Presença de calo ósseo		
Exuberante	3	Presença de calo, endosteal e periosteal, nas duas corticais
Moderada	2	Presença de calo, endosteal ou periosteal, nas duas corticais
Discreta	1	Presença de calo, endosteal ou periosteal, em uma das corticais
Ausente	0	Continuidade cortical
União óssea		
Completa	3	Preenchimento completo do espaço da osteotomia, nas duas corticais, com osso compacto e/ou bordas da osteotomia imperceptíveis
Moderada	2	Preenchimento parcial do espaço da osteotomia, mais dos 50% da cortical
Discreta	1	Preenchimento parcial do espaço da osteotomia, menos dos 50% da cortical
Ausente	0	Não união dos fragmentos ósseos

Modificado de An e colaboradores, 1999.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em parcelas subdivididas, com quatro tratamentos e cinco repetições cada, utilizando-se o programa SAS. Para cada variável foi determinada a média e o desvio padrão e realizada análise de variância (ANAVA). Os dados quantitativos foram analisados por métodos paramétricos e os dados qualitativos por métodos não paramétricos. A escolha do teste para comparação das médias foi determinada segundo o delineamento e o coeficiente de variação (CV) de cada variável (Sampaio, 2007), todos com níveis de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para avaliação das variáveis consumo, ganho de peso e densidade óssea foi utilizada análise de covariância. Assim sendo, para avaliar o consumo, utilizou-se o peso dos animais como covariável e o teste de Tukey (CV: 8,54) para a comparação entre as médias dos diferentes tratamentos. Para avaliar o ganho de peso dos animais, foi utilizando o peso inicial como covariável e o teste de Tukey (CV: 5,17) para a comparação entre as médias. Na avaliação da densidade óssea, usou-se a área como covariável e o teste t (CV: 45,04) para comparar as médias. Durante o experimento, um animal apresentou paralisia gastrointestinal, diminuindo drasticamente o consumo e o peso nos últimos dez dias de avaliação. Para não interferir na análise estatística, foram calculadas as parcelas perdidas (Sampaio, 2007).

Ao analisar os valores das variáveis Fluxo, *Pool* e Estática no estudo de cintilografia óssea, observou-se que apenas a Estática

apresentou distribuição normal. Para as variáveis Fluxo e *Pool* foram utilizadas transformações logarítmica e raiz quadrada respectivamente. Após a ANAVA, os dados foram submetidos à análise de regressão, considerada significativa quando $p < 0,05$.

Ao analisar os valores séricos e urinários de Ca, P e FA, observou-se que nenhum dos valores apresentou distribuição normal. Transformações logarítmicas e raiz quadrada foram aplicadas para tentar normalizar a distribuição dos dados. Para valores de Ca sérico e FA e P urinários, foi utilizado transformação logarítmica, enquanto para Ca urinário e FA e P séricos foi utilizado raiz quadrada. Após a ANAVA, os dados foram submetidos à análise de regressão, considerada significativa quando $p < 0,05$.

Por serem semiquantitativos, os parâmetros da avaliação radiográfica (reação periosteal, formação de calo ósseo, formação de ponte óssea, presença de linha de fratura e remodelação), foram analisados por testes não paramétricos, também com níveis de significância de 5% ($p < 0,05$). Foram utilizados os testes de Friedman para comparação das medianas entre os tempos e o teste de Kruskal-Wallis para comparação das medianas entre os tratamentos.

Para analisar os dados obtidos da avaliação histológica, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre tratamentos, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, o coelho como modelo experimental foi viável em vários aspectos como facilidade de acomodação e manuseio, custo da pesquisa, tempo de obtenção de resultados, dentre outros. Vantagens do uso desta espécie com fins de pesquisa foram relatadas por An e colaboradores (1999), que afirmam ser o coelho um dos animais mais comumente utilizados nas pesquisas ortopédicas, superando outras espécies experimentais como ratos, cães, cabras e camundongos, e acredita-se que continua assim ainda hoje. (An e *et al.* 1999; An e Friedman, 1999). Apesar disso, devido às diferenças anatômicas, biológicas e técnicas cirúrgicas utilizadas, nem sempre estes modelos fornecem parâmetros adequados para serem extrapolados para todas as espécies. O coelho foi o modelo animal mais utilizado entre os anos 1992 e 1996 para as pesquisas sobre fraturas e/ou osteotomias (An e Friedman, 1999). Acredita-se que a sua popularidade é o resultado da disponibilidade, custo, tamanho, facilidade de manuseio, acesso vascular e uma variedade de características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas. Dentre estas características, o tamanho e o fácil manuseio permitem ao pesquisador trabalhar em pequenos espaços com grupos experimentais grandes o suficiente para fornecer resultados estatisticamente confiáveis. Isto facilita inclusive, o controle das variáveis ambientais que possam influenciar a resposta e obter resultados mais confiáveis (Sampaio, 2007).

Neste trabalho, a docilidade desta espécie, especificamente da raça Nova Zelândia, possibilitou utilizar apenas a contenção

manual para execução da maioria dos exames realizados, como colheita de sangue e urina a cada oito dias, aplicação do LED a cada dois dias e radiografias a cada 15, o que reduziu significativamente a utilização de sedativos e o tempo de execução dos procedimentos. Além da docilidade, o tamanho contribuiu para facilitar o transporte dos animais para realização dos exames de radiografia e cintilografia óssea realizados a cada 15 dias, sendo que a cintilografia era realizada em área afastada daquela do experimento (faculdade de Farmácia).

Apesar de ser frequentemente usado o jejum sólido e hídrico no pré-operatório, este não foi realizado neste estudo, conforme recomendado por Lipman e colaboradores (2008) e nenhuma intercorrência foi verificada. O jejum pré-operatório é preconizado para minimizar os riscos de vômito durante a anestesia ou no pós-operatório, mas ainda não há um consenso a respeito disto no coelho. Alguns autores alegam que este animal é incapaz de vomitar e que seu estômago não se esvaziará mesmo depois de vários dias de jejum, devido em parte à coprofagia (Richardson, 2000; Harcourt-Brown, 2002; Flecknell, 2009). Outro fator a considerar é que coelhos com massa corporal inferior a 3kg, como os utilizados neste estudo, podem desenvolver acidose metabólica que quando associado a baixa de glicose decorrente do jejum, pode levar a obito pela incapacidade de compensação da acidose (Lipman *et al.* 2008). Por outro lado entretanto, o jejum alimentar de uma a 12 horas, é considerado benéfico, pois evita a presença de alimento na boca no momento da intubação, bem como reduz o volume do estômago, facilitando assim a respiração durante a

anestesia (Mason, 1997; Harcourt-Brown, 2002; Rich, 2002, Lipman *et al.* 2008). De forma geral, há consenso de que não há necessidade de remover a água antes da cirurgia.

Foi registrado um total de cinco óbitos (20%) nesta pesquisa, sendo quatro durante a indução anestésica (80%) e um durante o transoperatorio (20%). Em todos estes casos empregou-se o isoflurano administrado por meio de máscara com dose de manutenção de 1-2%. Apesar de ser este fármaco utilizado com frequência para anestesia em coelhos (Richardson, 2000; Harcourt-Brown, 2002), observou-se que os cinco animais que receberam o isoflurano como anestésico geral junto com diferentes protocolos préanestésicos vieram a óbito. Os resultados negativos da anestesia com isoflurano levaram à substituição do protocolo anestésico pela associação de anestesia epidural e propofol. Segundo Flecknell (2009), o principal problema com o uso do isoflurano em coelhos é a restrição respiratória como resposta do animal ao odor do fármaco, que pode ocorrer tanto durante a indução quanto durante a manutenção anestésica dos pacientes. Além disso, deve-se ressaltar que a intubação endotraqueal nos coelhos é uma técnica difícil de se realizar devido à anatomia do animal, causando na maioria das vezes laringoespasmos e danos iatrogênicos à laringe e/ou faringe (Harcourt-Brown, 2002; Percy e Barthold, 2007). A técnica de intubação endotraqueal às cegas requer muita prática e cuidados (Mason, 1997), motivo pelo qual optou-se inicialmente pela utilização de máscara para administração do isoflurano, técnica mais utilizada para a anestesia inalatória nesta espécie (Flecknell, 2009).

Segundo Brodbelt (2009), nos registros de mortalidade perioperatória em pequenos animais no Reino Unido, o coelho aparece como a terceira espécie mais comumente anestesiada depois do cão e do gato e chama a atenção o registro de alto índice de mortalidade, substancialmente maior (1,39%) do que nas outras duas espécies (cão: 0,17%, gato: 0,24%), devido ao uso de agentes sedativos e anestésicos. A maioria das mortes acontecia no pós-operatório (62%), seguido do trans (30%) e pré-operatório (6%) e nenhuma antes da pré-medicação (0%). É interessante notar que 59% das mortes registradas foram por causa indefinida e 39% das restantes, foram devido a causas cardiopulmonares (Brodbelt, 2009).

A anestesia epidural associada à sedação permitiu a realização do procedimento cirúrgico sem complicações. A duração do efeito anestésico da bupivacaina³⁴, na dose utilizada e associada com sedativos, foi de aproximadamente duas horas. Efeito semelhante é relatado na literatura, com duração anestésica em coelhos em torno de 100 minutos (Malinovsky *et al.* 1997; Malinovsky, 1999; Lipman *et al.* 2008).

A pesar dos coelhos serem rotineiramente utilizados em pesquisas que envolvem procedimentos cirúrgicos, são considerados como um dos animais de laboratório mais difíceis de anestésiar, sendo esta dificuldade atribuída a variações específicas da espécie em resposta à anestesia, tais como sensibilidade à depressão respiratória e limitação anatômica para intubação endotraqueal (Mason, 1997; Lipman *et al.* 2008).

³⁴ Neocaina® 5%, Cristália, RJ.

São relativamente escassas as pesquisas sobre manejo anestésico em coelhos e acredita-se que os óbitos registrados nesta pesquisa (20%) foram devido a múltiplos fatores. Segundo Brodbelt (2009), a relativa falta de experiência em anestésiar essa espécie, o manejo mais superficial dado a este tipo de paciente e o maior potencial de complicações, levam a um maior risco de morte anestésica. Desta forma, apesar da segurança inerente da maioria dos anestésicos de última geração, estes continuam sendo culpados pela mortalidade transoperatória nos coelhos. Existem outros motivos que podem contribuir para aumentar o risco anestésico nesta espécie, como o estresse causado por múltiplos fatores, hipóxia devida a fatores como o tipo de fármaco utilizado, doenças respiratórias, fatores mecânicos como compressão do tórax ou oclusão das vias aéreas e doenças preexistentes, que na maioria das vezes são subclínicas (Harcourt-Brown, 2002). Maior risco é observado, se mais de um destes fatores está presente no mesmo animal.

O coelho oferece vantagens para utilização em pesquisas quando comparado com outras espécies animais. Neste estudo, o tamanho do coelho possibilitou a utilização de dispositivos de fixação interna da osteotomia sem complicações e de tamanhos convencionais, comumente empregados para fixação de fraturas não experimentais em cães e gatos (Rich, 2002). Como citado por Hankenson e colaboradores (2003), a estrutura tubular e a espessura cortical dos ossos longos nos coelhos torna-os um modelo favorável em estudos de fixação óssea com pinos intramedulares. Além disso, segundo Norris e colaboradores (2001), a anatomia e a fisiologia ósseas do coelho apresentam semelhanças com a dos seres

humanos, sugerindo desta forma, a possibilidade de extrapolação de resultados. Contudo, devido ao metabolismo acelerado da espécie, observa-se um tempo mais curto de consolidação óssea, quando comparado com outras espécies animais (An *et al.* 1999; Richardson 2000; Hankenson *et al.* 2003), o que não interfere na extrapolação de resultados e facilita a realização dos estudos em termos de custo e disponibilidade do local.

Observou-se neste estudo que a abordagem medial do terço médio da tíbia é simples, devido à ausência de tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos importantes, assim como presença de apenas pequenos grupos musculares, tornando fácil o acesso ao osso (Popesko *et al.* 1992, Piermattei, 1993). A forma anatomicamente retilínea da tíbia permitiu uma fácil, rápida e adequada introdução dos pinos no canal medular para a fixação da osteotomia. Apesar da faixa etária e massa corporal semelhantes entre os coelhos, o diâmetro dos pinos empregados foi selecionado no momento da cirurgia, devido a variações do canal medular que levaram à utilização de pinos com diferentes diâmetros. O diâmetro do canal medular dos animais deste estudo, no terço médio da tíbia, variou entre quatro e seis milímetros aproximadamente, que levou ao emprego das associações de dois pinos de 1,5mm (10%), de dois de 2,0mm (30%) e de 1,5mm e 2,0mm (60%). O uso de mais de um pino dentro do canal medular proporcionou estabilidade ao foco da osteotomia, limitando a rotação dos fragmentos ósseos sobre seu eixo e permitindo consolidação de todas as osteotomias, como verificado radiograficamente. Sabe-se que a estabilização do foco da fratura é um dos fatores importantes para o sucesso da

consolidação (Doige, 1990; Webb e Tricker, 2000; Rich, 2002; Hungria, 2007; Schindeler *et al.* 2008), portanto, pelos resultados obtidos pode-se afirmar que o método utilizado nesta pesquisa exerceu a sua função de forma satisfatória e permitiu avaliar o efeito dos tratamentos testados. Além da estabilização, outro fator a ser considerado na consolidação óssea é a influencia do manuseio dos tecidos durante a intervenção cirúrgica.

Neste estudo ocorreu em um dos 20 coelhos, fissura do fragmento proximal da tíbia após a realização da osteotomia, devido à força excessiva aplicada à pinça autocentrante que alinhava os fragmentos ósseos, no momento em que era introduzido o primeiro pino intramedular. A fissura foi corrigida mediante colocação de duas cerclagens com fio de aço 0,6mm (Figura 23), que permitiu estabilizar o foco da osteotomia. À necropsia, observou-se que o fio de aço estava totalmente coberto pelo calo ósseo, indicando que este não interferiu negativamente no processo de consolidação óssea.



Figura 23. Imagem fotográfica da radiografia pósoperatória imediata, mostrando as duas cerclagens para fixação da fissura no fragmento proximal da tíbia.

Em dois coelhos ocorreu impactação dos fragmentos ósseos no pós-operatório imediato, possivelmente devido à instabilidade excessiva no foco da osteotomia (Figura 24). As impactações de aproximadamente 1mm e 4mm, verificadas radiograficamente, conferiram entretanto, estabilidade ao foco da osteotomia. Verificou-se projeção subcutânea proximal dos pinos no caso da impactação de 4mm. A irritação tecidual no terço proximal causada pelos pinos provocou seroma e estes foram cortados ao nível da articulação fêmoro-

tíbio-patelar para ajustar o tamanho e evitar a exposição dos mesmos e conseqüentemente do canal medular ao ambiente externo. Na impactação de cerca de 1mm não foi necessário realizar este procedimento, uma vez que não houve sinais de irritação local.



Figura 24. Imagem fotográfica da radiografia pósoperatória mostrando a impactação dos fragmentos proximal e distal da tíbia.

Todos os animais apresentaram evolução clínica satisfatória e a ferida cirúrgica cicatrizou por primeira intenção. Também, não houve evidência de alteração na saúde física ou no comportamento dos coelhos,

decorrentes da cirurgia, o que mostra que o método cirúrgico utilizado não produziu incapacidade ou sofrimento para os animais.

Aos 45 dias de experimento, um coelho do grupo B apresentou inapetência progressiva com redução drástica do peso corporal. Ao exame clínico as variáveis fisiológicas encontravam-se dentro dos parâmetros normais, foi observada desidratação leve, apatia e conteúdo gasoso à palpação abdominal. Radiografias contrastadas foram obtidas cinco dias após a mudança de comportamento do animal. Após três horas da administração do bário, as radiografias revelaram que o mesmo encontrava-se ainda no estômago, sendo eliminado parcialmente no dia seguinte. O diagnóstico presuntivo foi de obstrução parcial devido a bolas de pelo. Não foi realizado nenhum tipo de tratamento neste animal para não interferir com as avaliações do experimento, uma vez que restavam apenas dez dias para realização da eutanásia. À necropsia foi observado elevado conteúdo gástrico de bolas de pelo de diferentes tamanhos misturadas com meio de contraste e nenhuma outra alteração significativa foi observada. Segundo Harcourt-Brown (2002) e Percy e Barthold (2007) no coelho, a presença *postmortem* de pelo misturado com conteúdo estomacal no estômago é um achado normal.

Antigamente acreditava-se que a compactação de pelo e alimento (tricobezoar) no estômago era a causa primária de obstrução pilórica no coelho (Jenkins, 1997). Porém, hoje sabe-se que a hipomotilidade gastrointestinal, causada principalmente por dor, estresse e medo, leva ao acúmulo de pelo no estômago com a conseqüente formação de tricobezoaes e eventual obstrução gástrica (Richardson,

2000; Harcourt-Brown, 2002). Os tricobezoares são achados incidentais frequentes nas necropsias de coelhos (Percy e Barthold, 2007). Outros fatores como restrição de exercício, ingestão de toxinas, aderências pós-cirúrgicas, estresse ambiental, rotina, transporte, temperaturas extremas, umidade, dentre outros parecem estar relacionados com esta alteração (Reusch, 2005) Outra possível causa da hipomotilidade gastrointestinal são as dietas com conteúdos deficientes de fibra e excessos de carboidratos (Jenkins, 1997; Richardson, 2000, Reusch, 2005). Porém, neste caso é pouco provável, uma vez que os 20 coelhos receberam dois tipos de dietas rigorosamente controladas, ambas contendo quantidades iguais de fibra bruta e carboidratos, com níveis suficientes para esta espécie como recomendado na literatura (Blas e Mateos, 1998; Euler, 2009).

Como o coelho apresentou esta alteração aproximadamente aos 45 dias do pós-operatório, poder-se-ia pensar que foi independente do procedimento cirúrgico ou da dor causada pelo mesmo. Seria mais provável atribuir ao estresse a causa da hipomotilidade gastrointestinal apresentada neste coelho, e ainda, talvez à susceptibilidade individual. Pelo fato desse animal fazer parte do grupo tratado com o LED, estava submetido a estresse constante. No entanto, no momento em que o coelho desenvolveu a doença o protocolo das aplicações do LED já tinha terminado, há 10 dias.

O procedimento de aplicação do LED, entretanto, foi de fácil execução em todos os

coelhos. O posicionamento dos animais em decúbito dorsal e o ambiente tranquilo permitiram o manuseio e a aplicação da luz de forma simples, sem necessidade de contenção química. Durante a aplicação observou-se que o LED é uma fonte de luz que não produz desconforto para o paciente, possibilitando sua aplicação em coelhos, apesar desta espécie ser particularmente estressada. Nenhuma mudança significativa foi percebida no local de aplicação do LED durante o período de realização do tratamento nem nos dias subsequentes. Também, não foram observadas diferenças quando comparados com os animais que não receberam este tratamento.

As observações anteriores sugerem que o LED é um dispositivo de tratamento não invasivo que pode ser aplicado sem dificuldade nesta espécie.

A suplementação com o *Lithothamnium calcareum* administrou-se facilmente mediante inclusão na ração, como descrito na literatura (Dias, 2001; Melo *et al.* 2006; Pelícia *et al.* 2007; Melo *et al.* 2008) e em dose de inclusão previamente empregada em coelhos (Euler, 2009).

Na tabela 11 encontram-se os valores das médias e coeficientes de variação (CV) das variáveis consumo e ganho de peso nos diferentes tratamentos (A, B, C, D).

Para a variável consumo a ANAVA não mostrou diferença significativa das médias corrigidas entre os diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$) (tabela 12).

Tabela 11. Média de consumo diário e ganho de peso de coelhos alimentados com dieta convencional e dieta com inclusão de *L. calcareum* (0,75%)

Parâmetro	Tratamentos				CV
	A (<i>L. calcareum</i>)	B (<i>L. calcareum</i> + LED)	C (LED)	D (Controle)	
Consumo (g)	125,099	115,457	127,185	112,293	8,544
Ganho de peso (Kg)	3,492	3,595	3,454	3,268	5,168

L. calcareum: *Lithothamnium calcareum*; g: gramas; LED: *Light Emitting Diode*; SD: desvio padrão; CV: Coeficiente de Variação.

Tabela 12. Comparação entre tratamentos das médias corrigidas da variável consumo.

Tratamento	Media (g)
C	127,185 a
A	125,099 a
B	115,457 a
D	112,293 a

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

Os resultados de consumo encontrados nesta pesquisa estão dentro dos valores esperados para coelhos alimentados com dietas convencionais. Ainda, corroboram os dados do consumo reportados por Euler (2009) em estudo com coelhos em crescimento da raça Nova Zelândia, suplementados com o *L. calcareum*.

A suplementação com *L. calcareum* foi realizada sem dificuldades, pois foi incluído na ração como descrito na literatura (Dias, 2001; Melo *et al.* 2006; Pelícia *et al.* 2007; Melo *et al.* 2008) e em dose de inclusão previamente empregada em coelhos (Euler, 2009). A média do consumo da ração suplementada com o *L. calcareum* foi igual à ração normal, sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (figura 25B, tabela 12). Esta observação foi feita em outras espécies, segundo a literatura consultada (Dean *et al.* 2003; Pelícia *et al.*

2007). Por outro lado, este suplemento mineral não afeta negativamente o consumo de ração, podendo ser utilizada como fonte alternativa de cálcio na nutrição animal (Melo *et al.* 2008; Euler, 2009).

A variável ganho de peso, entretanto, mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que foram suplementados (A, B) e o grupo controle (D) ($p < 0,05$) (tabela 13, figura 25A).

Tabela 13. Comparação entre tratamentos das médias corrigidas da variável ganho de peso.

Tratamento	Media (Kg)
A	3,554 a
B	3,502 a
C	3,468 ab
D	3,284 b

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

A diferença no consumo entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), o que leva a pensar que, possivelmente, a inclusão do *L. calcareum* na dieta, teve um efeito positivo sobre a digestibilidade aparente da ração e/ou sobre a conversão alimentar dos animais, conforme relatado por Orsine e colaboradores (1989), em trabalho com bezerras e Pope e

colaboradores (2002) com frangos de corte. Segundo Melo e Moura (2009) a melhora na conversão alimentar pode estar relacionado com a alta solubilidade que apresenta o *L. calcareum* quando comparado com outras fontes de macro e microminerais. Segundo Melo e colaboradores (2006), essa característica está diretamente relacionada à absorção intestinal e à biodisponibilidade do produto, fator considerado também respectivamente por Airhart e colaboradores (2002) e Melo e colaboradores (2006), em seus trabalhos com ganho de peso de

pintinhos e desempenho de codornas japonesas em postura.

Por outro lado, entretanto, resultados diferentes foram reportados em outras pesquisas com coelhos (Euler, 2009), com codornas (Melo *et al.* 2008), com suínos (Dean *et al.* 2003) e com galinhas (Pelícia *et al.* 2007), que não mostraram diferenças significativas no ganho de peso dessas espécies quando suplementadas com *L. calcareum*.

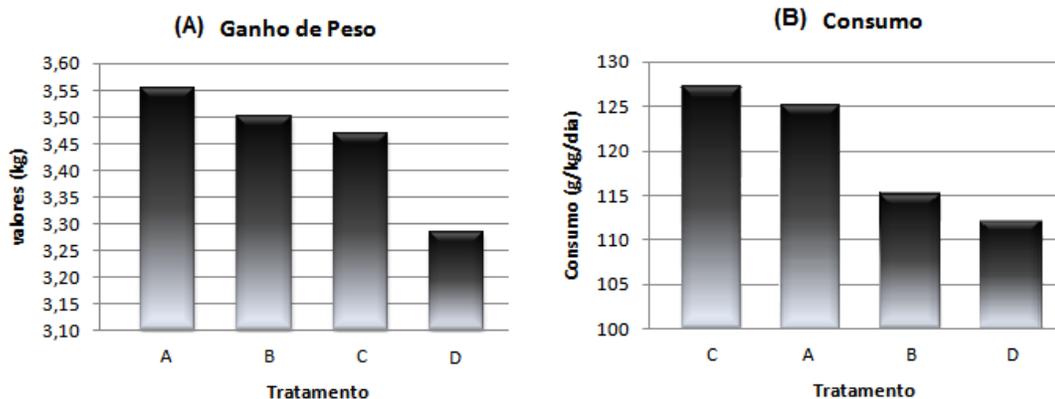


Figura 25. Gráfico das médias dos parâmetros (A) peso e (B) consumo dos animais nos diferentes grupos experimentais.

As atividades invasivas como colheita de sangue foram de fácil execução no coelho. A veia safena é um dos locais de colheita preconizado em coelhos, assim como a artéria marginal da orelha (Richardson, 2000; Harcourt-Brown, 2002). Nesta última, não é necessária a utilização de seringa para extração do sangue, sendo utilizada apenas uma agulha, já que o sangue arterial flui espontaneamente do vaso. Entretanto, neste estudo optou-se pela utilização apenas do ramo lateral da veia safena, para evitar lesão do pavilhão auricular, uma vez que foram realizadas múltiplas colheitas. Além disso,

observou-se que a quantidade de sangue colhida da artéria marginal da orelha, era dependente do período do dia. Aparentemente, quando a extração sanguínea era realizada à tarde o fluxo arterial era menor, com aumento significativo do tempo necessário para o procedimento. Isto aumentava o estresse causado ao animal e levava, na maioria das vezes, ao insucesso do procedimento e à necessidade de colheita na veia safena. Isto é devido, provavelmente, à diminuição do metabolismo dos animais neste período do dia.

Apesar da fácil execução da colheita sanguínea, observou-se que após a centrifugação das amostras para obtenção do soro, aproximadamente um terço das alíquotas apresentava hemólise. Segundo Harcourt-Brown (2002), é difícil obter amostras sanguíneas de boa qualidade em coelhos. Segundo o autor, hemólise e formação de coágulos são as alterações mais comumente observadas, possivelmente, pelas características inerentes à membrana das hemácias que são mais finas.

As concentrações séricas e urinárias de Ca, P e FA em função do tempo pós-operatório, mostraram variações como indicado nas tabelas 14, 15, 18, 19, 21, 22. O intervalo dos valores de referência para Ca, P e FA, são inconsistentes na literatura. Segundo Harcourt-Brown (2002), diferenças nas técnicas de análise dos parâmetros podem levar à desigualdade dos resultados. Ainda, diferenças significativas entre a raça, o sexo e/ou a idade têm sido observadas para alguns parâmetros bioquímicos em coelhos de laboratório (Melillo, 2007) assim como o efeito do sofrimento, da estação do ano ou da temperatura diária (Emanuelli *et al.*, 2008)

Observou-se neste estudo que os valores da concentração de Ca, tanto no soro quanto na urina de coelhos, foram evidentemente maiores que as descritas em outras espécies animais (Kaneko *et al.* 2008). Ao analisar os valores, observou-se que apenas para as concentrações séricas de Ca foi encontrada interação estatisticamente significativa entre os tempos e os tratamentos ($p < 0,05$) (tabela 14). Equações de regressão linear, quadrática e cúbica foram encontradas para

os tempos, sendo todas significativas ($p < 0,05$), com valores de R² de 71,63%, 82,64% e 91,58% respectivamente. Apenas a regressão quadrática foi utilizada para explicar o comportamento no tempo, uma vez que é a curva que melhor descreve o comportamento desta variável (figura 26).

Diferença estatística significativa entre os tempos ($p < 0,05$), mas não entre os tratamentos ($p > 0,05$), foi encontrada na comparação dos valores de Ca urinário, porém, não houve interação significativa entre eles. Apenas a equação de regressão quadrática foi significativa ($p < 0,05$), porém, com R² de 30,89%.

As concentrações pré-cirúrgicas de Ca total no soro dos animais deste estudo, foram em média 3,45mmol/L (13,84mg/dL) com valores máximo de 7,73mmol/L e mínimo de 3,22mmol/L. O intervalo dos valores de referência normais para o Ca sanguíneo varia segundo a literatura e mostra inconsistência entre os autores, como apresentado na tabela 16. Apesar destas diferenças, a média dos valores encontrados no tempo zero nesta pesquisa, foi semelhante ao reportado na literatura (tabela 16), sendo discretamente superior aos valores citados por Harkness e Wagner (1993), Mader (1997) e Richardson (2000). Existem poucos trabalhos sobre as concentrações urinárias de Ca, devido talvez ao fato de que no coelho geralmente, a taxa de excreção urinária de Ca é cerca de 45–60% (Melillo, 2007), sendo que o excesso ingerido na dieta é diretamente excretado na urina (Richardson, 2000) sem relevância clínica (tabela 15).

Tabela 14. Média dos valores da concentração sérica de Ca (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.

Tratamento	Tempo (dias do pós-operatório)									Média
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
A	3,558 Ab	3,234 Ab	2,674 Ab	3,127 Aa	3,009 Aa	3,174 Aa	3,468 Aa	3,184 Aa	3,139 Aa	3,174
B	6,402 Ba	3,443 Ab	3,323 Aba	3,508 Aa	2,979 Aa	3,189 Aa	2,959 Aa	3,014 Aa	2,700 Aa	3,502
C	3,310 Cb	4,955 Aa	3,728 Ba	3,424 Ca	2,864 Ca	2,909 Ca	2,774 Ca	2,939 Ca	2,726 Ca	3,292
D	3,957 Ab	3,458 Ab	3,084 Aba	3,298 Aa	3,370 Aa	3,156 Aa	3,149 Aa	3,318 Aa	2,844 Aa	3,293
Média	4,307	3,772	3,202	3,339	3,055	3,107	3,088	3,114	2,852	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

Tabela 15. Média dos valores da concentração urinária de Ca (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.

Tratamento	Tempo (dias do pós-operatório)									Média
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
A	12,725	8,433	11,178	11,098	8,782	5,549	7,635	10,479	7,486	9,263 a
B	10,230	12,275	8,832	6,467	7,385	6,786	9,581	9,431	8,819	8,867 a
C	6,687	7,350	9,132	5,539	4,092	7,335	10,479	6,886	6,582	7,120 a
D	6,936	8,533	7,984	8,383	3,693	7,884	9,980	8,832	9,421	7,961 a
Média	9,144 A	9,148 A	9,281 A	7,872 B	5,988 B	6,889 B	9,419 A	8,907 A	8,077 A	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

Tabela 16. Valores de referência do Ca sanguíneo em coelhos segundo diferentes autores.

Valores de Referência (mmol/L)	Autores	Ano de publicação
3,50	Kamphues	1986
1,40 – 3,19	Harkness e Wagner	1993
	Mader	1997
1,39 – 3,11	Richardson	2000
3,20 – 3,70	Goad <i>et al.</i>	1989
	Harcourt-Brown	2002
2,74 – 3,49	Melillo	2007
1,46 – 3,60	Kaneko <i>et al.</i>	2008

Fonte: Harkness e Wagner, 1993; Mader, 1997; Richardson, 2000; Harcourt-Brown, 2002; Kaneko *et al.* 2008.

Segundo Harcourt-Brown (2002), variações na ingestão e no conteúdo de Ca das dietas fornecidas aos animais poderiam explicar algumas destas discrepâncias, uma vez que os níveis de Ca total no soro e na urina refletem diretamente o aporte nutricional

(Mateos e Blas, 1998; Richardson, 2000, Redrobe, 2006; Melillo, 2007).

Ao analisar os valores em função do tempo, observa-se que as concentrações séricas de Ca diminuíram gradativamente até o final do período experimental com uma aparente estabilização nas últimas duas semanas do experimento (Figura 26A). As concentrações urinárias se comportaram de forma semelhante, porém, no final do experimento houve aumento próximo aos valores iniciais (figura 26B). Nota-se que os valores séricos estiveram dentro dos intervalos normais de referencia reportados na literatura para esta espécie (tabela 16) (Harkness e Wagner, 1993; Mader, 1997; Richardson, 2000; Kaneko *et al.* 2008).

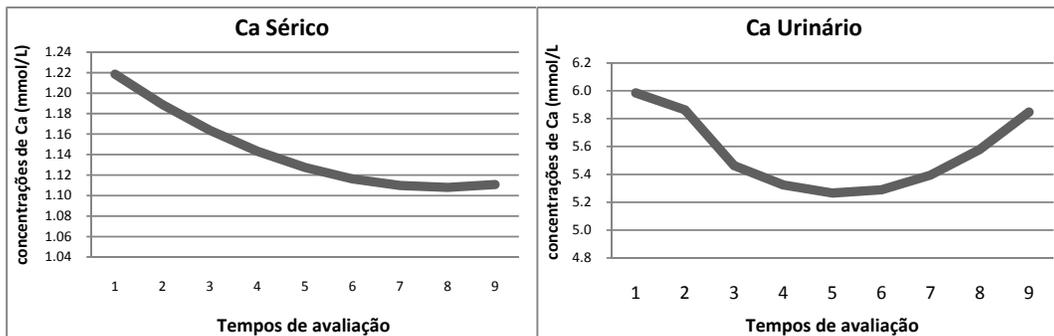


Figura 26 Gráfico do comportamento das concentrações sérica e urinária de cálcio (Ca) em função do tempo.

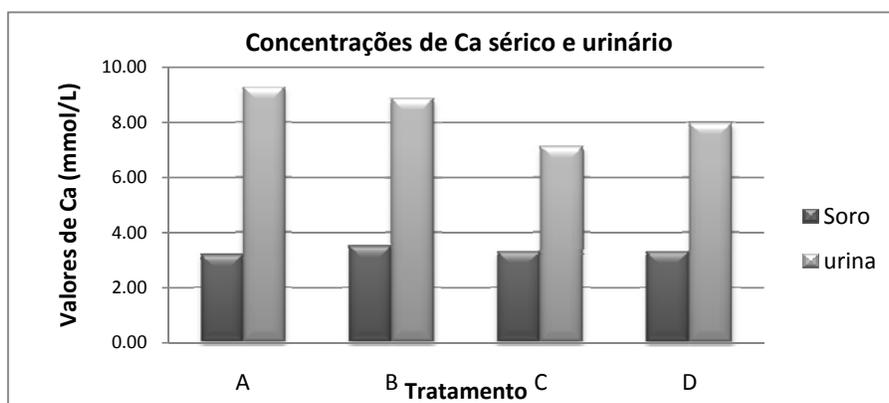


Figura 27 Gráfico apresentando o comportamento da concentração sérica e urinária de cálcio (Ca). Comparação entre grupos experimentais.

Este comportamento das concentrações sérica e urinária de Ca pode ser devido à resposta fisiológica do organismo à demanda de Ca (Schindeler *et al.* 2008).

As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) das concentrações séricas de Ca encontradas entre os grupos experimentais foram observadas apenas nos primeiros 15 dias do experimento (Tabela 14). Nos tempos de avaliação subsequentes a concentração sérica de Ca foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) entre todos os tratamentos.

Embora estatisticamente não significativa ($p > 0,05$), foi observada uma maior excreção urinária de Ca por parte dos animais dos grupos tratados com a suplementação por *L. calcareum* (A e B), quando comparados com os grupos que receberam a dieta não suplementada (C, D) (figura 27). Isto pode ser devido à maior quantidade deste mineral na dieta suplementada com a alga, uma vez que nos coelhos a absorção de Ca é independente das necessidades metabólicas, sendo o excesso excretado principalmente na urina (McDowell, 1992; Mateos e Blas, 1998; Redrobe, 2006; Melillo, 2007).

Com relação à concentração sérica de FA, observou-se nesta pesquisa que os valores encontrados foram altamente variáveis nos diferentes tempos avaliados (tabela 18), devido, provavelmente, à instabilidade da enzima no organismo. Os valores séricos normais de referência para a FA em coelhos variam significativamente na literatura, mostrando grandes inconsistências entre os autores, como indicado na tabela 17. Segundo Harcourt-Brown (2002), a utilização de diferentes técnicas de análise nas pesquisas poderia explicar, em parte, essas variações. Outros fatores como idade,

dieta, sexo, sofrimento, estação do ano ou temperatura diária, foram sugeridos como variáveis intervenientes nos resultados (Melillo, 2007, Emanuelli *et al.* 2008).

Tabela 17. Valores de referência de FA em sangue de coelhos segundo diferentes autores.

Valores de Referência (UI/L)	Autores	Ano de publicação
112,00 – 350,00	Harkness e Wagner	1995
4,00 – 16,00	Mader	1997
15,00 – 90,00	Richardson	2000
10,00 – 70,00	Harcourt-Brown	2002
12,00 – 96,00	Melillo	2007
106,20 – 133,80	Kaneko <i>et al.</i>	2008

Tabela 18. Média dos valores séricos de FA (UI/L) nos diferentes grupos experimentais em função do tempo avaliado.

Tratamento	Tempo (dias do pós-operatório)									Média
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
A	62,80	63,40	28,60	77,52	91,34	97,46	89,08	93,12	81,56	76,10 a
B	131,62	27,00	61,00	54,80	50,80	50,02	70,26	53,92	84,60	64,89 a
C	80,40	66,60	49,20	57,12	39,04	86,80	93,18	100,00	51,28	69,29 a
D	70,00	54,40	140,60	18,48	45,02	79,20	56,80	68,68	42,70	63,99 a
Média	86,21 A	52,85 A	69,85 A	51,98 A	56,55 A	78,37 A	77,33 A	78,93 A	65,04 A	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste t (p<0,05).

Tabela 19. Média dos valores urinários de FA (UI/L) nos diferentes grupos experimentais em função do tempo avaliado.

Tratamento	Tempo (dias do pós-operatório)									Média
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
A	17,000	21,400	35,600	7,200	11,400	6,800	5,400	27,200	15,740	16,416 a
B	42,000	17,200	82,200	4,400	10,000	9,600	62,600	19,400	19,400	29,644 b
C	42,400	10,000	21,200	20,100	7,000	22,800	11,000	24,000	21,400	19,989 ba
D	26,580	27,800	37,400	72,200	25,400	60,800	37,000	75,600	27,180	43,329 b
Média	31,995 A	19,100 B	44,100 B	25,975 B	13,450 B	25,000 B	29,000 B	36,550 A	20,930 A	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste t (p<0,05).

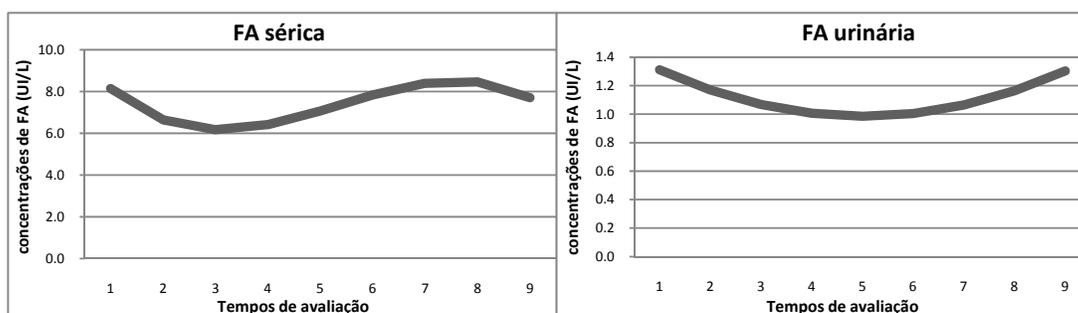


Figura 28 Gráfico do comportamento das concentrações sérica e urinária de cálcio (Ca) em função do tempo.

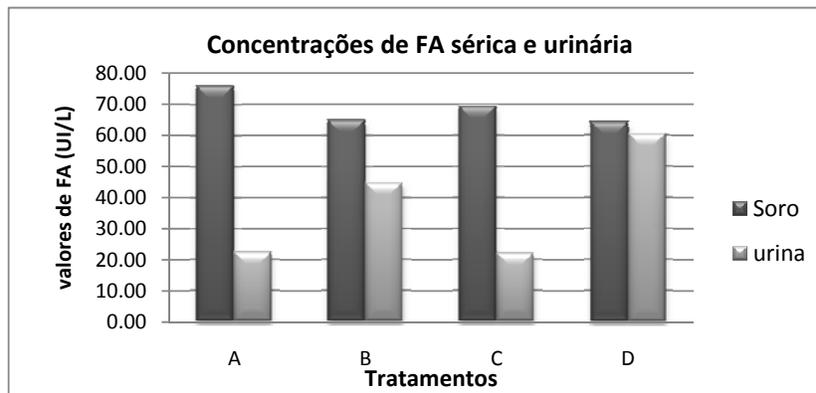


Figura 29. Gráfico apresentando o comportamento da concentração sérica e urinária de fosfatase alcalina (FA). Comparação entre grupos experimentais.

As concentrações séricas de FA neste estudo estão dentro dos intervalos normais de referência reportados por Richardson (2000), Harcourt-Brown (2002) e Melillo e colaboradores (2007). A análise dos resultados mostrou que não houve interação estatisticamente significativa entre os tempos e os tratamentos ($p > 0,05$) (tabela 18). Apenas a equação de regressão cúbica foi significativa ($p < 0,05$) para representar as variações da concentração sérica de FA nos tempos avaliados, com valor R^2 de 89,16% (figura 28) e equação de regressão quadrática para as concentrações urinárias ($R^2: 50,54\%$) (figura 28), no entanto, estas não explicam o comportamento fisiológico da variável. Estatisticamente, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) das concentrações séricas de FA entre os tempos avaliados nem entre os diferentes grupos experimentais (tabela 18).

As concentrações séricas de FA para os grupos B e C, foram semelhante às do grupo controle (D) (tabela 18, figura 29), sendo discretamente maiores. Segundo Matsuzaka e colaboradores (2004), a estimulação *in vitro* com luz *laser* promove proliferação

significativa dos osteoblastos. Porém, os autores observaram que as concentrações de FA no grupo irradiado foram iguais às do grupo controle (Matsuzaka *et al.* 2004). Com base nesse relato pode-se pensar que o LED poderia ter promovido o efeito bioestimulador sem interferência com as concentrações séricas de FA. Para o grupo A (*L. calcareum*) foram encontrados valores séricos de FA semelhantes aos dos outros grupos experimentais ($p > 0,05$) (tabela 18) e valores urinários menores em relação aos outros grupos experimentais (B,C,D) ($p < 0,05$), (tabela 19) mas sem relevância clínica.

As médias das concentrações séricas de P encontradas neste estudo estão aumentadas com relação aos valores de referência normais para esta espécie publicados na literatura (tabela 20). Esses resultados podem ter sido devidos à hemólise observada após a centrifugação das amostras. Segundo Harcourt-Brown (2002), a hemólise e formação de coágulos comumente observadas nas alíquotas sanguíneas de coelhos, pode alterar o resultado das análises. Como o P está presente dentro da célula, as concentrações

séricas são facilmente aumentadas pela hemólise (Melillo, 2007).

Tabela 20. Valores de referência de P sanguíneo em coelhos segundo diferentes autores.

Valores de Referência (mmol/L)	Autores	Ano de publicação
1,29 – 2,00	Harkness e Wagner	1993
1,28 – 1,92	Harcourt-Brown	2002
1,29 – 2,10	Melillo	2007
1,15 – 1,45	Kaneko <i>et al.</i>	2008

Ao analisar os valores séricos e urinários de P, observou-se que não houve interação entre os tempos e os tratamentos ($p > 0,05$) (tabelas 21 e 22). Apenas a equação de regressão quadrática foi significativa ($p < 0,05$) para representar as variações das concentrações sérica e urinária de P nos tempos avaliados, com valores R² de 89,16% e 62,39% respectivamente (figura 30)

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) das concentrações séricas e urinárias de P entre os grupos experimentais, mas sim entre os tempos avaliados ($p < 0,05$) (tabelas 21 e 22, figuras 30 e 31).

Apesar da importância do P para o organismo e em especial para o tecido ósseo (McDowell, 1992, Committee... *et al.* 2005; Morais e Burgos, 2007), concentrações sanguíneas de P em coelhos são de difícil interpretação e são fisiologicamente influenciadas por diferentes fatores como ingestão, níveis na dieta, absorção intestinal e/ou distúrbios metabólicos (Richardson, 2000). Segundo Harcourt-Brown (2002), existe pouca informação sobre a relevância clínica das concentrações séricas de fosfato em coelhos e o aumento pode ser útil apenas no diagnóstico de doença renal (Melillo, 2007).

Tabela 21. Comparação entre as médias dos valores da concentração sérica de P (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.

Tratamento	Tempo (dias do pós-operatório)									Média
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
A	1,989	2,105	3,235	2,480	2,519	2,667	1,976	1,718	2,551	2,360 a
B	1,421	3,022	1,976	2,525	3,468	2,209	2,028	1,731	1,879	2,251 a
C	2,351	2,067	4,075	3,093	1,769	2,163	1,808	2,215	2,344	2,432 a
D	2,693	1,963	3,675	2,460	2,964	2,170	2,357	1,744	1,621	2,405 a
Média	2,113 A	2,289 A	3,240 B	2,640 B	2,680 B	2,302 A	2,042 A	1,852 A	2,099 A	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

Tabela 22. Comparação entre as médias dos valores da concentração urinária de P (mmol/L) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental.

Tratamento	Tempo (dias do pós-operatório)									Média
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
A	0,387	0,413	0,536	0,749	1,150	1,175	0,601	0,633	0,588	0,692 a
B	0,407	1,066	0,710	0,614	0,930	0,678	1,292	0,607	0,581	0,765 a
C	0,749	0,452	0,459	0,646	1,150	0,736	0,620	0,743	0,575	0,681 a
D	0,542	0,717	0,575	0,445	0,814	1,305	1,027	0,626	0,323	0,708 a
Média	0,521	0,662	0,570	0,613	1,011	0,974	0,885	0,652	0,517	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

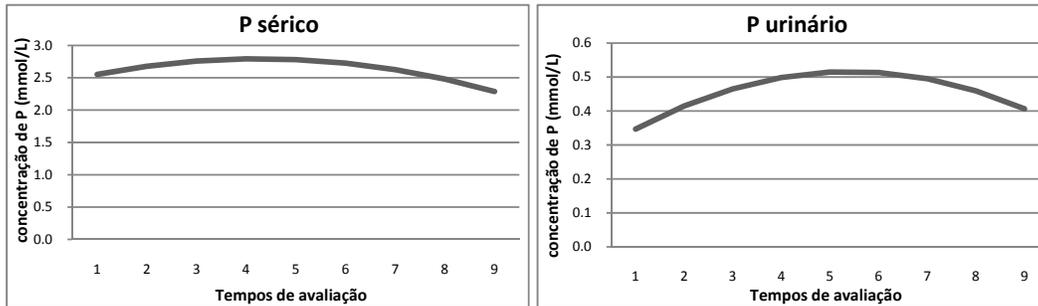


Figura 30 Gráfico do comportamento da concentração sérica e urinária de fósforo (P) em função do tempo.

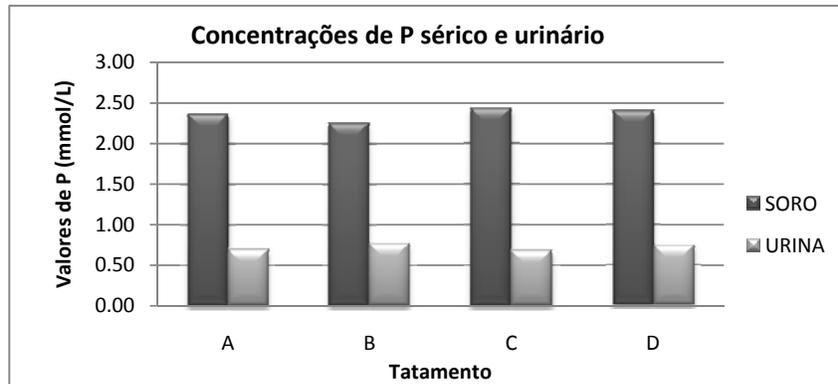


Figura 31 Gráfico apresentando o comportamento da concentração sérica e urinária de fósforo (P). Comparação entre grupos experimentais.

Os exames radiográficos possibilitaram acompanhar satisfatoriamente a evolução do processo de consolidação da osteotomia (tabela 23 e figuras 32, 33, 34, 35, 36), não sendo necessária a sedação dos animais. A contenção manual dos coelhos em decúbito dorsal para a projeção VD e em decúbito lateral direito para a projeção ML do MPD foi suficiente para a realização do exame.

No pós-operatório imediato verificou-se em todos os animais o correto posicionamento dos pinos na tíbia e a coaptação dos fragmentos ósseos (figura 32). Redução da osteotomia foi satisfatória em todos os

animais. Em alguns casos a extremidade proximal dos pinos ficou maior do que 0,5cm, mas sem significado clínico. Nas avaliações subsequentes verificou-se a consolidação em todos os grupos, como mostram as figuras 33, 34, 35 e 36. Aos 15 dias observa-se em todos os animais do grupo A (*L. calcareum*) e D (controle), calo ósseo com bordas lisas e ponte óssea (figura 33 A e D) e bordas irregulares nos animais dos outros grupos (B e C) (figura 33 B e C). A linha de osteotomia estava presente em todos, sendo mais evidente nos grupos B (*L. calcereum*+LED) e C (LED) (figura 33). Aos 30 dias verificou-se evolução do quadro

em todos os animais com redução do calo ósseo e características radiográficas de remodelação, naqueles dos grupos A e D (figura 34 A e D), presença de ponte óssea e calo com bordas lisas nos dos grupos B e C (figura 34 B e C). Neste período a linha de fratura era menos evidente em todos os animais (figura 34). Aos 45 dias já se verificava continuidade cortical com remodelação avançada em todos os coelhos (figura 35). O aspecto radiográfico nos animais dos grupos A e D era mais avançado do que os demais. Aos 60 dias verificou-se radiograficamente, processo de remodelação mais avançado, mais ainda não completamente finalizado (figura 36) (Schelling, 1991). Nos animais do grupo B (*L. calcaruem*+LED) e C (LED) verificou-se ainda, uma linha tênue de menor densidade e o calo era maior do que nos demais, sugerindo evolução discretamente mais lenta do processo. A formação do calo ósseo está associada à presença de micromovimento no

foco da osteotomia, resultado esperado quando se emprega o pino intramedular como dispositivo de fixação de fraturas (Doige, 1990). O calo ósseo é neste tipo de fixação, um resultado benéfico, porque confere estabilidade à osteotomia e permite a evolução favorável do processo de reparação óssea, como observado neste estudo. A linha de osteotomia foi se tornando menos evidente no decorrer do período experimental, característica da evolução do processo de consolidação óssea (Doige, 1990; Hungria 2007).

Diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de avaliação ($p<0,05$), mas não entre os grupos experimentais ($p>0,05$) foram observadas em todos os parâmetros considerados. Nas tabelas 23 e 24, apresentam-se as medianas dos cinco parâmetros analisados nos diferentes tempos de avaliação e nos tratamentos.

Tabela 23. Comparação dos valores das medianas dos parâmetros avaliados na radiografia. Reação Periosteal (RP), formação de Ponte Óssea (PO), formação de Calo Ósseo (CO), presença de Linha de Osteotomia (LO) e Remodelação (R), avaliados nos diferentes tempos T0 (antes da cirurgia), T15 (15 dias), T30 (30 dias), T45 (45 dias), T60 (60 dias).

Tempo (dias)	Parâmetro				
	RP	PO	CO	LO	R
T0	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
T15	1,667 b	0,667 ab	1,667 b	0,667 ab	0,333 ab
T30	1,000 c	2,167 bc	2,000 b	1,667 bc	1,333 bc
T45	1,000 c	2,667 c	1,500 b	2,500 cd	2,333 c
T60	0,000 a	2,667 c	1,667 b	2,833 d	2,500 c

Medianas seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Friedman ($p<0,05$).

Tabela 24. Comparação dos valores das medianas dos parâmetros avaliados na radiografia Reação Periosteal (RP), formação de Ponte Óssea (PO), formação de Calo Ósseo (CO), presença de Linha de Osteotomia (LO) e Remodelação (R), avaliados nos diferentes tratamentos. A (*L. calcaruem*), B (*L. calcaruem*+LED), C (LED), D (controle).

Tratamento	Parâmetro					Total
	RP	PO	CO	LO	R	
A	1,000 a	2,333 a	1,333 a	2,333 a	1,667 a	8,666
B	1,000 a	2,333 a	1,667 a	1,667 a	1,333 a	8,000
C	1,000 a	2,000 a	1,667 a	1,667 a	1,667 a	7,668
D	1,333 a	2,000 a	1,667 a	1,667 a	1,000 a	7,667

Medianas seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

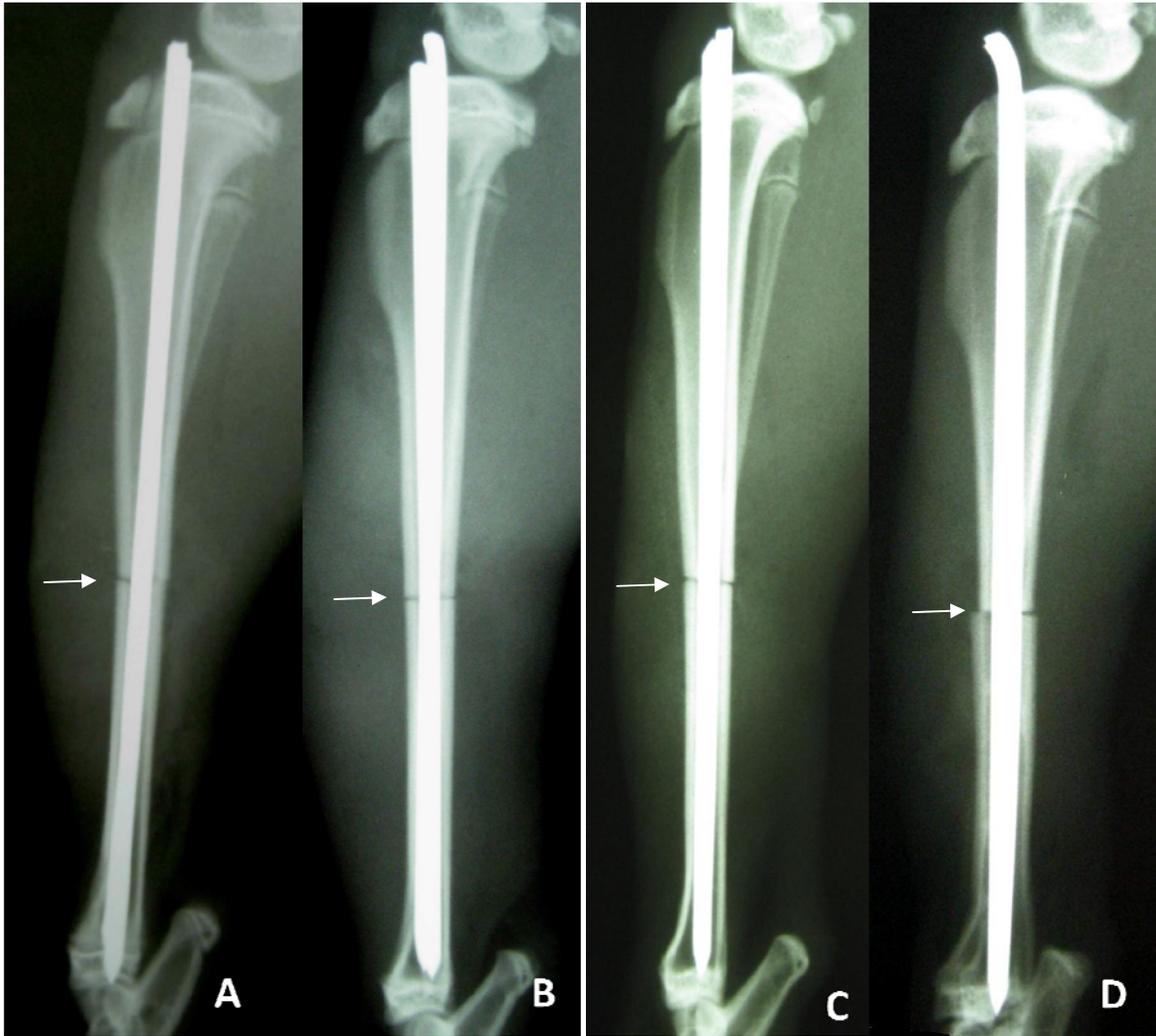


Figura 32. Imagem fotográfica da radiografia pós-operatória imediata. Observa-se a osteossíntese e a linha da osteotomia no terço médio da tíbia (seta branca) em projeção ML. (A) grupo A - *L. calcareum*, (B) grupo B - *L. calcareum*+LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.



Figura 33. Imagem fotográfica da radiografia aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se formação de calo ao redor da osteotomia no terço médio da tíbia (projeção ML) com superfície irregular, linha de osteotomia menos definida e início da formação de ponte óssea. (A) grupo A - *L. calcareum*, (B) grupo B - *L. calcareum*+LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.



Figura 34. Imagem fotográfica da radiografia aos 30 dias de pós-operatório. Observa-se o calo ao redor da osteotomia no terço médio da tíbia com superfície lisa (projeção ML), presença da linha de osteotomia parcial e pouco definida e formação de ponte óssea completa. (A) grupo A - *L. calcareum*, (B) grupo B - *L. calcareum*+LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.



Figura 35. Imagem fotográfica da radiografia aos 45 dias de pós-operatório. Observa-se calo ósseo discreto com superfície lisa e densidade mineral semelhante àquela da cortical (projeção ML). (A) grupo A - *L. calcareum*, (B) grupo B - *L. calcareum*+LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.



Figura 36. Imagem fotográfica da radiografia aos 60 dias de pós-operatório., Observa-se calo ósseo discreto com superfície lisa e visibilização do canal medular do lado direito do pino (seta branca) (projeção ML). (A) grupo A - *L. calcareum*, (B) grupo B - *L. calcareum*+LED, (C) grupo C - LED, (D) grupo D - Controle.

Apesar de semelhantes radiograficamente, verificou-se nos animais tratados com LED (B e C) evolução discretamente mais lenta do que os demais.

Diversas pesquisas têm relatado os efeitos da luz do *laser* sobre diversas situações no tecido ósseo, demonstrando efeitos anabólicos (Bartels, 2002, Guzzardella *et al.* 2003; Khadra *et al.* 2004; Lopes *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2008), mas o efeito do LED permanece ainda relativamente pouco estudado neste tecido (Brawn e Kwong-Hing, 2007; Kim *et al.* 2008). A maioria dos trabalhos com emprego do LED tem sugerido um efeito anabólico deste dispositivo sobre a reparação de tecidos moles (Whelan *et al.* 2001; Casalechi *et al.* 2008).

Liu e colaboradores (2007) observaram que a irradiação por *laser* aumentou o volume do calo ósseo em relação ao controle e atribuiu este achado à propriedade do *laser* sobre a proliferação celular, como têm sido sugerido em estudos *in vitro* onde observaram ter aumento da proliferação dos osteoblastos (Matsuzaka *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2008). Matsuzaka e colaboradores (2004), utilizando GaAlAs diodo *laser*, evidenciaram aumento significativo dos osteoblastos na fase proliferativa. Os autores acima relatam não haver diferenças significativas na fase de diferenciação celular. Porém, luz proveniente de dispositivos LED, que também tem sido avaliada *in vitro*, parece promover a diferenciação de células precursoras do tecido ósseo, como demonstrado recentemente por Kim e colaboradores (2008), que em estudo utilizando LED com 647nm de comprimento de onda com diferentes tempos de aplicação (10, 30 e 90

seg.) e densidades energéticas (0.093J, 0.279J e 0.836J) observaram diferenciação de células tronco mesenquimais de rato em osteoblastos.

Na avaliação cintilográfica neste estudo, foi verificada a hipercaptação do radiotraçador (99mTc-MDP) na área de osteotomia, possibilitando a avaliação dinâmica do processo de consolidação óssea, complementando as informações radiográficas (figuras 38, 39, 40, 41, 42). Esta técnica diagnóstica permite informações mais detalhadas sobre os tecidos moles no local da osteotomia, imperceptíveis nas radiografias, uma vez que esta define com maior precisão a estrutura óssea.

Observa-se em todas as imagens (figura 38, 39, 40, 41, 42), durante todo o período experimental, captação aumentada nas epífises ósseas de todos os coelhos. Isto representa grande atividade metabólica local nestes animais que estavam em fase de crescimento e está dentro do esperado (Matin, 1979; Hughes, 1980).

Aos 15 dias de avaliação, na fase de fluxo, observou-se maior captação do radiotraçador ao longo da diáfise da tíbia, o que representa o aumento da vascularização local (figura 39) (Wilson, 1991). Nas fases de pool e estática, a captação do radiotraçador foi mais localizada, delimitando o local da lesão no terço médio da tíbia do MPD (figura 39). Verificando as tabelas 25 e 26, pode-se observar o aumento da irrigação local característico do processo de consolidação óssea neste período (Wilson, 1991). Estes resultados são condizentes com os observados radiograficamente aos 15 dias de avaliação (figura 33).

Aos 30 e 45 dias, observou-se, durante todas as fases, uma redução progressiva da captação local do radiotraçador em todos os animais (figuras 40 e 41) o que corrobora os achados correspondentes à evolução observada nas imagens radiográficas nos mesmos períodos (figuras 34 e 35). Essa redução foi verificada até os 60 dias, período final do estudo, quando se observava alguma captação, indicativa de pequena atividade óssea local, compatível com o aspecto radiográfico de remodelação em fase final (figuras 36 e 42) e com os achados histológicos (Eckelman e Levenson, 1997;

Nutton *et al.*, 1985; Thrall e Ziessman, 2003). Neste período o IA na fase de fluxo foi próximo daquele no tempo zero, não havendo diferença estatística entre os valores ($p < 0,05$) (tabela 25). Como esta fase estuda de forma dinâmica a irrigação local (Saha, 2004), o resultado leva a concluir que a vascularização local está retornando à situação pré-operatória. Isto significa que o processo de reparação óssea está finalizando, como verificado aos exames radiográfico e histológico que revelam processo avançado de remodelação óssea.

Tabela 25. Comparação entre as médias do IA da fase de FLUXO (cpm) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental. A (*L. calcareum*), B (*L. calcareum*+LED), C (LED), D (controle).

Tratamento	Tempo (dias)					Total
	T0	T15	T30	T45	T60	
A	1,032	1,369	1,250	1,105	1,137	1,179 a
B	1,056	1,457	1,486	1,311	1,124	1,287 a
C	1,073	1,394	1,295	1,210	1,097	1,214 a
D	1,048	1,278	1,331	1,313	1,147	1,223 a
Total	1,052 A	1,374 B	1,341 B	1,235 C	1,126 A	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Tabela 26. Comparação entre as médias do IA da fase de POOL (cpm) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental. A (*L. calcareum*), B (*L. calcareum*+LED), C (LED), D (controle).

Tratamento	Tempo (dias)					Total
	T0	T15	T30	T45	T60	
A	0,999	1,510	1,381	1,215	1,168	1,255 a
B	1,000	1,823	1,554	1,355	1,208	1,388 a
C	1,000	1,760	1,399	1,236	1,315	1,342 a
D	1,000	1,740	1,438	1,261	1,165	1,321 a
Total	0,999 A	1,708 B	1,443 C	1,266 D	1,214 D	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Tabela 27. Comparação entre as médias do IA da fase ESTÁTICA (cpm) nos diferentes tratamentos em função do tempo experimental. A (*L. calcareum*), B (*L. calcareum*+LED), C (LED), D (controle).

Tratamento	Tempo (dias)					Total
	T0	T15	T30	T45	T60	
A	1,003	2,092	1,650	1,400	1,323	1,494 a
B	1,010	2,510	1,921	1,647	1,406	1,699 a
C	0,996	2,522	1,855	1,664	1,472	1,702 a
D	1,018	2,408	1,985	1,445	1,408	1,653 a
Total	1,007 A	2,383 B	1,853 C	1,539 C	1,402 D	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK ($p < 0,05$).

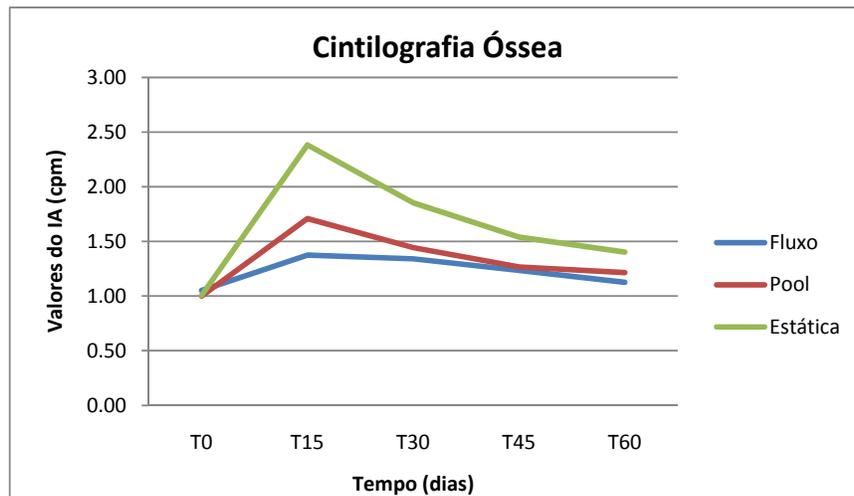


Figura 37. Gráfico do comportamento da captação de ^{99m}Tc -MDP, pelo tecido ósseo, em função do tempo experimental (T0,T15,T30,T45,T60) comparando as três fases (Fluxo, *Pool* e Estática).

A captação dos compostos de fósforo marcados com ^{99m}Tc é pouco compreendida (Thrall e Ziessman, 2003). Sabe-se, que a deposição no osso é fortemente influenciada por fatores inerentes a este, como atividade metabólica, fluxo sanguíneo e conteúdo de Ca, mas também inerentes à natureza do radiotraçador como a taxa de permeabilidade e coeficiente de difusão (Hoghes, 1980; Shani *et al.* 1990; Bahk, 2000).

Acredita-se que o mecanismo normal de absorção dos radiotraçadores no osso cortical seja por difusão passiva através dos vasos capilares do sistema de Havers, seguido da união à matriz inorgânica do osso. A distribuição desses radiotraçadores não é uniforme e está relacionada com a disposição vascular e a natureza do osso (Hughes, 1980). Para o ^{99m}Tc -MDP, supõe-se que inicialmente ocorra adsorção à matriz mineral do osso, com pequena ligação à matriz orgânica (Shani *et al.* 1990). A captação é significativamente maior no

fosfato de Ca amorfo do que no cristal de hidroxiapatita maduro, fato que pode explicar a intensa fixação nas áreas de atividade osteogênica aumentada (Schwochau, 2000; Thrall e Ziessman, 2003).

É importante saber, que a captação aumentada dos radiotraçadores no osso, não é devida somente às áreas com aumento de atividade osteogênica. Em condições patológicas como nas fraturas, se produz um aumento do fluxo sanguíneo local devido à neovascularização durante o processo normal de reparação óssea, o que permite uma melhor distribuição e chegada de maiores quantidades do radiotraçador à matriz do osso, produzindo, desta forma, uma hipercaptação na área lesada (Matin, 1979; Hughes, 1980). No osso, os processos patológicos que cursam com aumento, tanto do fluxo sanguíneo quanto da osteogênese, resultam em maior captação dos radiotraçadores.

Ao analisar a captação na fase de Fluxo, observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os tempos de avaliação ($p < 0,05$), mas não entre os tratamentos ($p > 0,05$) (tabela 23). Nos estudos de cintilografia óssea, a fase de fluxo realizada no primeiro minuto após injeção do radiotraçador, representa o fluxo sanguíneo e é usada para avaliar as suas alterações (Thrall e Ziessman, 2003; Saha, 2004; Zhou *et al.* 2008). Os resultados aqui apresentados (15 dias) mostram com evidência um aumento no fluxo sanguíneo representado pela diferença do IA, observada quando comparados com o controle, realizado antes da cirurgia (T0) (tabela 23, figura 40d).

Analisando a tabela de resultados do fluxo (tabela 23, figura 37), observa-se uma evolução no processo de regeneração óssea, representado por uma diminuição gradual do IA, como sugerido na literatura (Matin, 1979).

Os resultados foram semelhantes em todos os grupos experimentais, sendo iguais estatisticamente ($p > 0,05$), como mostram as tabelas 25, 26 e 27.

Um aumento significativo do IA nas fases de fluxo e *Pool* para os grupos tratados com LED (B e C) era esperado, mas isto não foi observado, uma vez que não houve diferença

significativa ($p > 0,05$) quando comparados com o grupo controle (D), inclusive nas fases iniciais de aplicação (tabelas 25 e 26, figura 43). Efeitos angiogênicos têm sido sugeridos como consequência da aplicação do LED, como demonstrado por Corazza e colaboradores (2007) em estudo com ratos. Os autores avaliaram o efeito do LED sobre a vascularização cutânea, utilizando comprimento de onda de 635nm e potência de 90mW, e verificaram diferença significativa na irrigação local do grupo irradiado quando comparado com o controle. Segundo os autores, esses resultados podem estar associados com uma redução das células inflamatórias, assim como à estimulação de fatores de crescimento angiogênicos durante a fase inicial de cicatrização. No entanto, esses resultados não foram observados neste trabalho. Resultados diferentes com relação ao efeito deste dispositivo sobre a angiogênese têm sido sugeridos por Pöntinen e colaboradores (1996), que utilizaram a luz LED de 635nm de comprimento de onda e 112,5mW de potência sobre feridas cutâneas e observaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 36% no fluxo sanguíneo. Na opinião dos autores, as diferenças nos efeitos fotobiomoduladores, podem estar relacionadas à potência da luz e não à coerência da mesma.

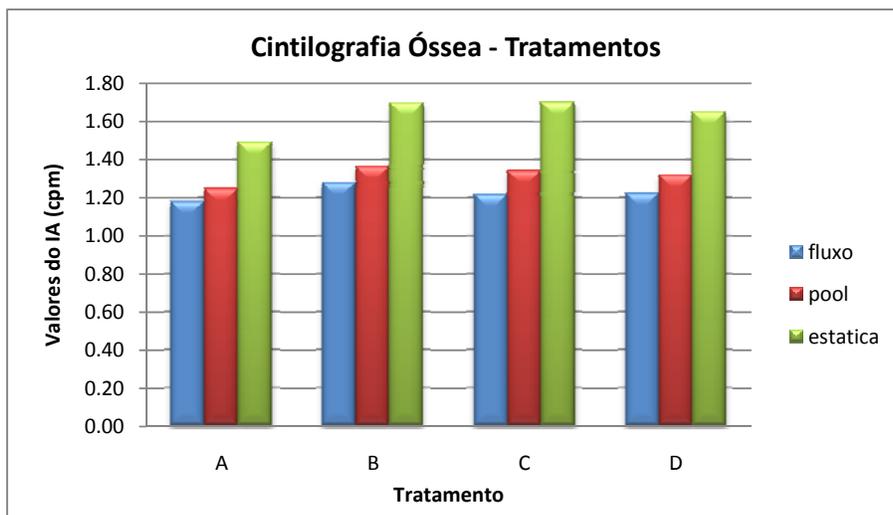


Figura 43. Gráfico do comportamento da captação de $^{99m}\text{Tc-MDP}$, pelo tecido ósseo nas três fases (Fluxo, Pool e Estática), comparando entre tratamentos (A,B,C,D).

O $^{99m}\text{Tc-MDP}$ mostrou-se eficiente como radiotraçador do sistema esquelético, como citado na literatura (Rocha e Harvert, 1979; Schwochau, 2000; Rijk, 2003; Thrall e Ziessman, 2003; Zhou *et al.* 2008). A cintilografia óssea é uma técnica simples não invasiva, sensível e foi efetiva no acompanhamento do processo de consolidação de osteotomia em coelhos (Figuras 38, 39, 40, 41, 42). Além disso, seu uso nesta pesquisa permitiu o acompanhamento periódico, com mensurações em diferentes tempos de avaliação, sem necessidade de realizar eutanásia do animal experimental e sem alterar a análise histológica.

Embora a TC seja realizada em indivíduos vivos (LeBlanc *et al.* 2007; Adams, 2009), por razões econômicas, neste estudo, foram utilizados apenas os fragmentos ósseos para a avaliação da densitometria (figuras 21 e 22). Os valores encontrados neste trabalho estão dentro da faixa de normalidade do tecido ósseo sadio, como reportado na

literatura (An, 1999, LeBlanc *et al.* 2007; Adams, 2009).

No presente trabalho, não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (tabela 28). Esses resultados sugerem que os tratamentos avaliados neste estudo, não alteraram a densidade mineral dos ossos no período final de avaliação, mantendo-se semelhante àqueles observados nos animais do grupo controle (D) que não receberam tratamento adicional.

Tabela 28. Valores das medias da densidade óssea nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Média (UH)
B	327,868 a
D	318,129 a
C	263,445 a
A	246,219 a

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste t ($p < 0,05$).

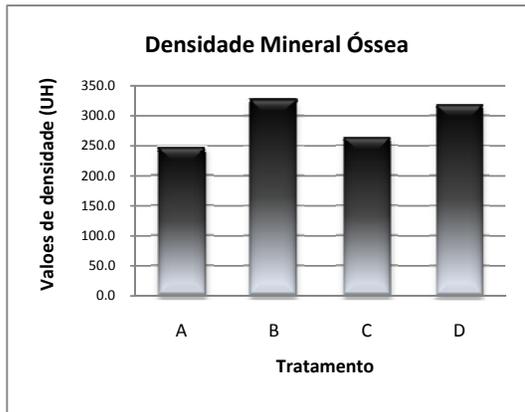


Figura 44. Gráfico apresentando as médias da densidade mineral óssea (UH). Comparação entre grupos experimentais.

Apesar de não ter sido significativo estatisticamente ($p > 0,05$), observa-se uma discreta redução da DMO nos animais dos grupos A e C quando comparados com os grupos B e D (Tabela 26). Liu e colaboradores (2002) relatam, após o emprego do LLLT (830nm de comprimento de onda, potência de $200\text{mW}/\text{cm}^2$, intensidade energética de $10\text{J}/\text{cm}^2$) no tratamento de osteotomia, aumento da DMO na fase inicial de consolidação óssea. Neste trabalho, entretanto, a DMO foi avaliada no final do período experimental (60 dias), quando o processo de consolidação encontrava-se em fase final de remodelação (fig. 36).

Quiçá, para futuras pesquisas utilizando o coelho como modelo experimental, seria interessante considerar avaliações em menor tempo do pós-operatório.

Resultados que sugerem modificação na parte mineral do osso observados após suplementação com o *L. calcareum* foram citados por Pope e colaboradores (2002) em estudo com frangos de corte na fase de

crescimento. Diante desses resultados, o questionamento que deve ser considerado é se a DMO, verificada à TC, expressaria a eficiência ou a qualidade do calo ósseo.

Embora sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$), no grupo B (LED+*L. calcareum*) observa-se maior DMO quando comparado com os outros grupos experimentais (A, C, D) (tabela 28). Os dados estão, entretanto, dentro dos valores de referencia normais para a densidade óssea (An, 1999; Lopez-Ben *et al.* 2006; Muñiz e Casanovas, 2006; LeBlanc *et al.* 2007; Adams, 2009). Este resultado poderia sugerir, uma fase menos avançada de remodelação, o que foi corroborado com a análise histológica, na qual este grupo mostrou evolução mais lenta (figura 46).

Os nutracêuticos têm sido introduzidos comercialmente para tratamento ou prevenção de distúrbios metabólicos (Andlauer e Furst, 2002), com resultados variáveis no tratamento de patologias ósseas (Doetsch *et al.* 2004, Neumann *et al.* 2004). Resultados de suplementação com Ca e vitamina D têm demonstrado efeitos anabólicos sobre a densidade mineral e formação do calo ósseo quando utilizados no tratamento conservativo de fraturas proximais de úmero em humanos com osteoporose (Doetsch *et al.* 2004). Outros trabalhos, entretanto, têm relatado resultados pouco satisfatórios do uso de suplementações minerais no reparo de fraturas (Ilich e Kerstetter, 2000). Isto acontece, provavelmente, em resposta a um comportamento fisiológico. Sabe-se que a exigência de Ca é determinada principalmente pelas necessidades esqueléticas (uma vez que este mineral representa uma parte significativa da

estrutura dos ossos) e exerce um comportamento limitante (Hazewinkel, 1994; Ilich e Kerstetter, 2000). Isto significa que possivelmente a resposta esquelética positiva à suplementação, será observada somente nos casos de deficiência quando ocorre a reposição de Ca até a zona limite fisiológica. Segundo Ilich e Kerstetter (2000) a adição de Ca, em casos de ingestão dietética além do limiar, provavelmente não irá interferir na massa óssea. Avaliações sequenciais da DMO junto com outros parâmetros podem ser realizadas em futuros estudos, que permitam inferir mais detalhadamente, qual a influencia dos minerais presentes no *L. calcareum* sobre as fases iniciais do processo de consolidação óssea.

Na avaliação histológica observou-se que o corte longitudinal feito nos fragmentos

ósseos permitiu a classificação e comparação do processo de consolidação óssea entre grupos experimentais, aos 60 dias do pós-operatório (figuras 45, 46, 47, 48) (Gruber e Stasky, 1999; Eurell e Van Sickle, 2006). Os resultados da avaliação histológica apresentam-se na tabela 29.

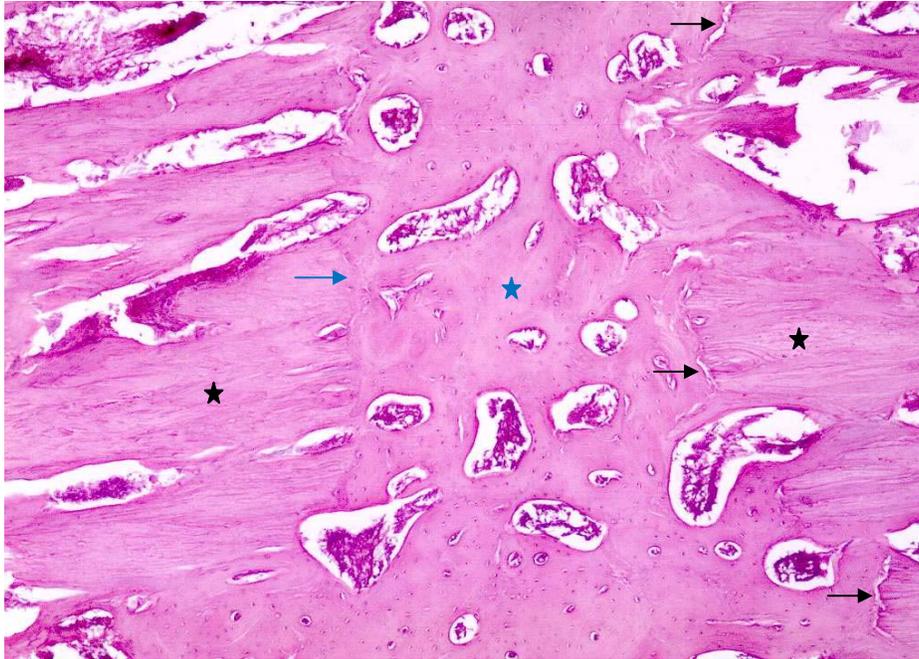


Figura 45. Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo A (x4). União óssea (seta azul), fenda de osteotomia (seta preta), osso antigo (estrela preta) e osso novo (estrela azul).

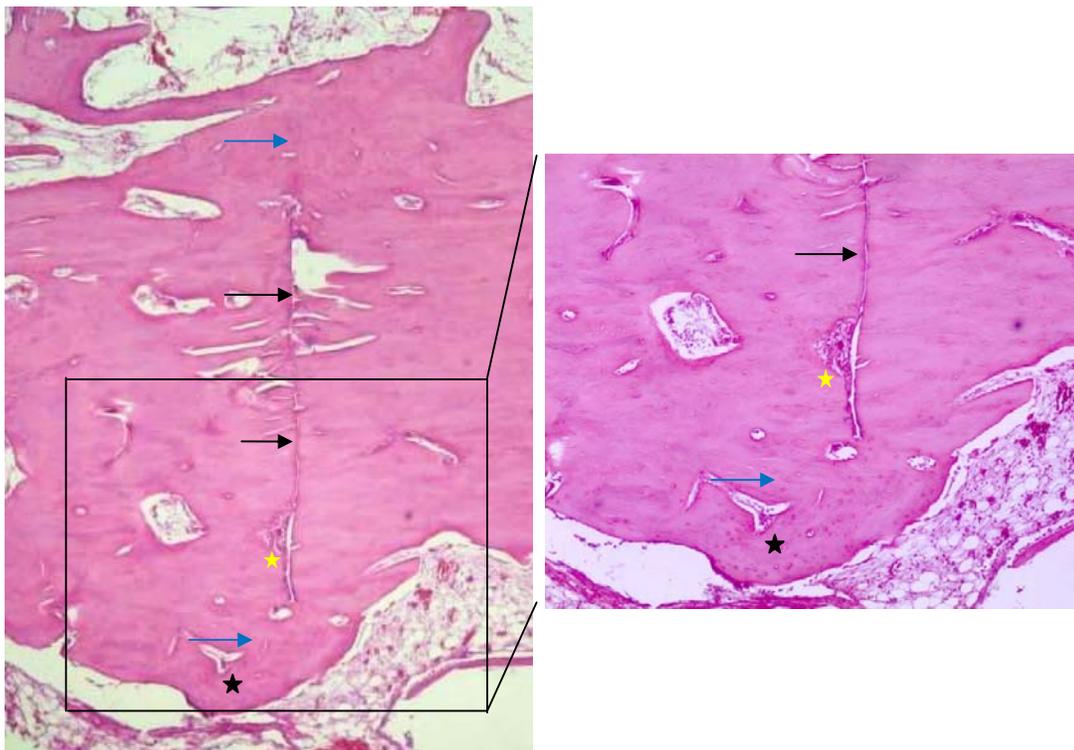


Figura 46. Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo B (x4). Observam-se áreas de união óssea (seta azul), linha da osteotomia (seta preta) com áreas de reabsorção da superfície óssea pelos osteoclastos (estrela amarela), calo ósseo (estrela preta).

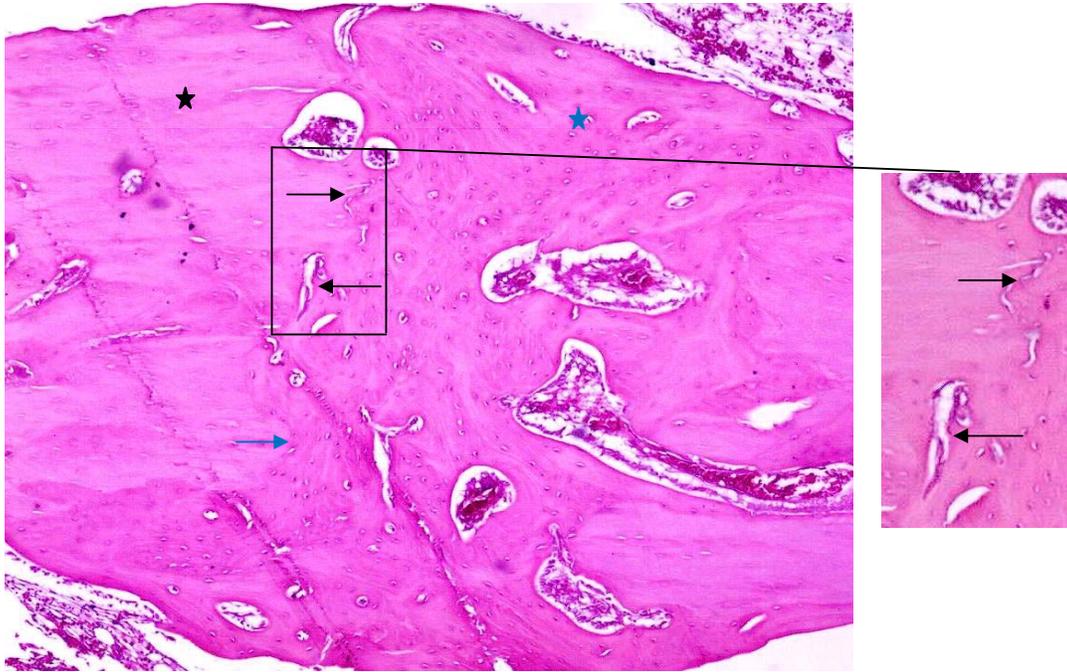


Figura 47. Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo C (x4). União óssea (seta azul), fendas de não união (seta preta), osso antigo (estrela preta) e osso novo (estrela azul).

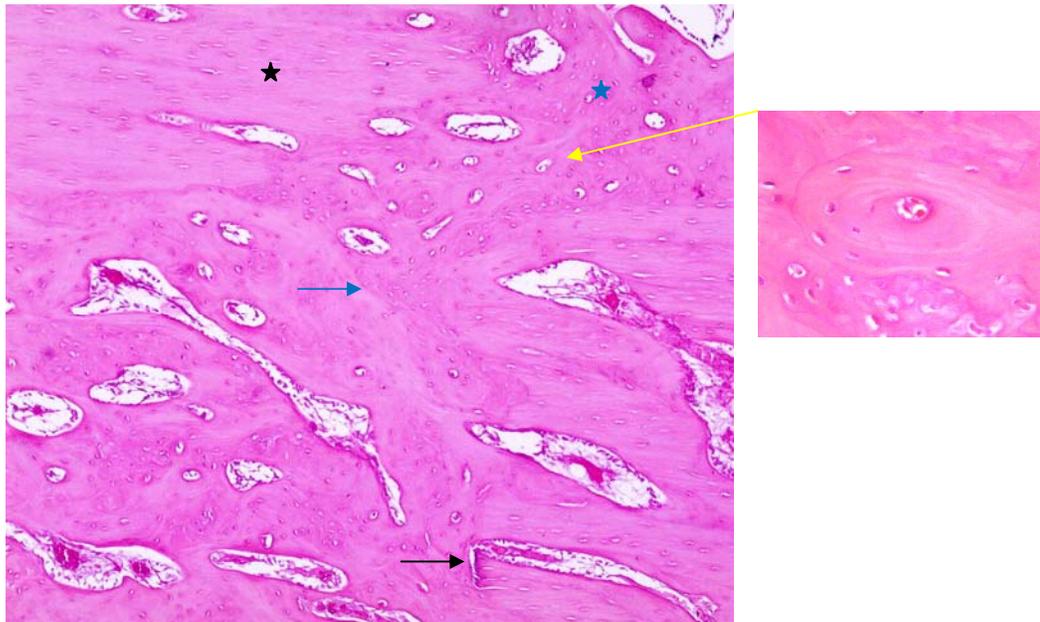


Figura 48. Microfotografia de osso cortical (corte longitudinal), do grupo D (x4). União óssea (seta azul), fenda de osteotomia (seta preta), osteons secundários (seta amarela), osso antigo (estrela preta) e osso novo (estrela azul).

Tabela 29. Valores das medianas da avaliação histológica nos diferentes tratamentos. CO: presença de calo ósseo, UO: união óssea.

Tratamento	CO	UO
A	0,00 a	2,66 a
B	1,00 a	1,33 b
C	1,00 a	2,00 a
D	2,00 a	3,00 a

Medianas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

A avaliação histológica mostrou consolidação em todos os animais. Verificou-se presença de osteons secundários e primários, túneis vasculares com presença de osteoclastos nas áreas de remodelação da linha de osteotomia em alguns animais, e discreto calo ósseo endosteal e/ou periosteal, compatíveis com processo normal de consolidação óssea (Thomas e Richter, 1984; Schelling, 1991, Kaderly, 1991; Pöntinen *et al.* 1996; Hungria, 2007).

Um animal do grupo C (LED), apresentou reação de tipo corpo estranho na região medular em uma das corticais, onde observou-se aumento de fibrina, presença de células gigantes e formação de tecido conjuntivo circunjacente à lesão, semelhante a uma cápsula. O que provocou esta reação no tecido pode ter acontecido, provavelmente, no trans-cirúrgico, durante a osteotomia, devido à localização da lesão. Sabe-se que os implantes ósseos podem ter efeitos adversos sobre o esqueleto. Restos particulados de implantes promovem uma resposta por meio de macrófagos ou de células gigantes, que podem levar à reabsorção óssea (Doige, 1990). Segundo Rich (2002), os coelhos possuem uma elevada tendência à formação excessiva de tecido de granulação em resposta a material estranho, tipo suturas, tanto em tecidos

moles quanto duros. No entanto, neste coelho não foram observadas partículas no tecido avaliado, nem foi registrado nenhum problema clínico durante e/ou após a cirurgia. Também, nas avaliações radiográfica e cintilográfica nos diferentes tempos não foi percebida qualquer alteração neste animal. Segundo Doige (1990), a necrose óssea pode ser clínica e radiograficamente inaparente.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, na união óssea ($p < 0,05$), mas não na presença de calo ósseo ($p > 0,05$) (tabela 29). Os animais dos grupos A (*L. calcareum*) e D (controle) apresentaram em média, menor formação de calo ósseo quando comparados com os outros grupos experimentais (B, C) que mostraram resultados semelhantes entre si. União completa dos fragmentos ósseos foi verificada em 60% (3) dos animais do grupo A. Os 40% (2) restantes apresentaram pequenas fendas isoladas lembrando a osteotomia, com presença de osteoclastos que indicavam reabsorção da superfície e remodelação (figura 45). É importante notar que nos animais do grupo B (*L. calcareum*+LED), a linha de osteotomia estava presente em todos (figura 46) e em maior extensão quando comparado com os demais grupos experimentais (A, B, D), características de processo de consolidação óssea menos avançado. Nesta variável ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Predomínio de osteons primários e principalmente, presença da linha de osteotomia em grande área da cortical (figura 46) com discretos sinais de remodelação em algumas áreas, sugerem retardo no processo de consolidação em relação aos animais dos demais grupos (A, C e D). Nenhum sinal patológico no tecido foi

observado nestes animais. A ausência de trabalhos avaliando a associação destes dois tratamentos e a escassa literatura elucidando os mecanismos de ação destes sobre o tecido ósseo dificultam o esclarecimento do provável efeito negativo observado neste estudo. Segundo Smith (1991), dentre os efeitos gerados pela estimulação com luz *laser*, está a modificação na permeabilidade e no transporte da membrana celular, alterando os canais de Ca. Diante desta hipótese, poder-se-ia pensar que o LED provavelmente bloqueou a entrada de cálcio à célula e consequentemente influenciou no metabolismo e proliferação celular. Porém, esta modificação nos canais de Ca parece aumentar o influxo deste íon na célula (Karu, 1999, Pinheiro e Gerbi, 2006).

Cabe também considerar efeitos independentes do tratamento, como aqueles decorrentes da osteossíntese e da intervenção cirúrgica propriamente dita, que podem levar eventualmente a retardo na consolidação óssea (Denny e Butterworth, 2000; Doblaré *et al.* 2004; Perumal e Roberts, 2007). No entanto, nenhuma alteração particular foi registrada durante a cirurgia dos animais deste grupo experimental, com exceção da paralisia gastrointestinal apresentada em um dos animais no final do período experimental. Cabe esclarecer que a cirurgia de todos os animais realizou-se sempre pela mesma equipe cirúrgica, sendo os coelhos distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais.

Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas avaliando os efeitos do *L. calcareum* sobre a regeneração do tecido ósseo ou para explicar a resposta anabólica que tem sido sugerida decorrente da suplementação com esta alga.

No entanto, Assoumani (1997), em experimento com ratos, relatou que a farinha de algas apresentou vantagens em relação ao calcário no crescimento do fêmur e na biodisponibilidade de Ca, sugerindo que provavelmente a concentração de Mg e a porosidade da alga seriam os responsáveis por estas diferenças. Recentemente, em estudo com cães, Teixeira (2008) observou efeitos positivos do *L. calcareum* sobre a consolidação de defeito ósseo, atribuindo tal resposta à combinação de nutrientes presentes no suplemento. Também, em relato de caso, foi observada consolidação satisfatória de fratura ulnar em equino adulto tratado conservativamente com arnica e *L. calcareum* durante 30 dias (Palhares *et al.* 2008). O fato é que nas deficiências minerais, a suplementação pode ser benéfica e parece influenciar a fase de maturação.

O fato desta pesquisa ter sido conduzida em animais sadios pode ser a razão das diferenças observadas neste trabalho com relação à suplementação com *L. calcareum* sobre a consolidação óssea. De acordo com Ilich e Kerstetter (2000), os nutrientes minerais como zinco, cobre, ferro, magnésio, flúor e manganês influenciam no metabolismo dos tecidos conectivos de diferentes formas. Esses elementos atuam como coadjuvantes na mineralização óssea, maturação do colágeno, metabolismo do cálcio, atividade osteoblástica e desenvolvimento ósseo normal (Ilich e Kerstetter, 2000; Perumal e Roberts, 2007; Samuelson, 2007). Acredita-se que a utilização de modelos animais com deficiências nutricionais poderia, provavelmente, comprovar a ação benéfica dos elementos balanceados presentes no *L. Calcareum* (Lopez-Benito *et al.* 2006). Também, animais geriátricos, nos quais a

utilização de nutrientes pelo organismo é menos eficiente podem, quiçá, serem beneficiados pelas qualidades de solubilidade e biodisponibilidade do produto.

Os efeitos da fototerapia no osso ainda são controversos na literatura. Acredita-se que as discrepâncias entre resultados publicados com emprego do LED discutidos ao longo deste trabalho, se devem possivelmente às diversas situações em que foi utilizado, uma vez que a magnitude do efeito da terapia na regeneração óssea parece depender não somente da dose total de aplicação, mas da fase fisiológica da célula no momento da irradiação (Karu, 1989; Karu *et al.* 2005; Millis *et al.* 2005; Pinheiro e Gerbi, 2006). Diferenças entre os dispositivos empregados nas terapias fotodinâmicas (LED ou Laser) têm sido discutidas na literatura e descartam as características físicas da luz emitida como a causa da discrepância nos resultados obtidos (Karu, 1999; Whelan *et al.* 2001; Corazza *et al.* 2007; Desmet *et al.* 2006).

Pesquisas conduzidas *in vitro* demonstraram que o tratamento fotobiomodulador é mais efetivo quando realizado em fases iniciais de maior proliferação celular (Vinck *et al.* 2003; Matsuzaka *et al.* 2004; Huang *et al.* 2007), muito embora, nesta pesquisa, apesar de ter respeitado esta observação, não foi possível demonstrar diferenças significativas, provavelmente, pelos tempos de avaliação utilizados, uma vez que Khadra e colaboradores (2004), em estudo com ratos, demonstraram que os efeitos benéficos do LLLT (830nm, 75mW, 23J/cm²) foram evidentes histologicamente aos 14 dias após iniciado o tratamento (p<0,05), com aumento da formação de vasos sanguíneos e tecido fibroso, mas não observaram

diferenças significativas quando comparado aos 28 dias do experimento (p>0,05). Liu e colaboradores (2007), sugeriram aceleração da consolidação óssea de osteotomia em coelhos, após 40 dias de irradiação com LLLT (830nm, potência de 200mW/cm², dose diária de 40J/cm²). De forma semelhante, Queiroga e colaboradores (2008), demonstraram aumento da formação óssea em defeito no fêmur em ratos, após avaliação histológica do tecido 15 dias depois da irradiação com LLLT (780nm, 40mW, 200J/cm²). Desta forma, poderia ser considerado, para futuros estudos, tempos menores de avaliação histológica após aplicação do tratamento com LED.

Além disso, não é apropriado fazer a suposição de que os tratamentos avaliados nesta pesquisa podem ter efeitos semelhantes em tecidos doentes e saudáveis e cabe considerar que, quiçá, a fototerapia funcione apenas nos casos de danos teciduais graves ou em estados patológicos, e que os efeitos da luz nos processos de regeneração de tecidos sadios, onde as células são funcionais, se existirem, poderão não ser evidentes ou ser simplesmente insignificantes, como sugerido por Karu (1989) e Smith, (1991). Corroborando esta afirmação, Brawn e Kwong-Hing (2007), sugerem que o aumento da produção de ATP como fonte de energia para aumentar a função e o metabolismo celular decorrente da estimulação com LED, acontece em tecidos isquêmicos, lesados, intoxicados ou pouco perfundidos. Desta forma, futuros trabalhos poderiam ser desenvolvidos estudando os prováveis efeitos anabólicos do LED, em situações com alteração da função do tecido ósseo, e eventual comprometimento do processo de consolidação, onde, talvez, possa sim ser

corroborado o potencial deste dispositivo na regeneração óssea.

Devido ao limitado número de pesquisas publicadas conduzidas em modelos animais, avaliando o emprego do LED sobre a consolidação de fraturas, a maioria das comparações entre resultados são feitas com trabalhos que empregaram o *Laser* como fonte fotobiomoduladora. A principal diferença entre o LED e o *laser* está nas características da luz emitida e existem diversos trabalhos discutindo a influência do tipo de luz empregado sobre os efeitos anabólicos alcançados (Smith, 1991; Millis *et al.* 2005; Enwemeka, 2006; Mikail, 2009). Segundo diferentes autores, parece que estas características não influenciam a resposta gerada no tecido (Karu, 1999; Karu *et al.* 2005; Corazza *et al.* 2007). Acredita-se que esta comparação entre os dispositivos é possível sempre que se tenha adequado conhecimento sobre as diferenças entre as fontes biomoduladoras e sejam aplicadas as modificações necessárias para conseguir efeitos replicáveis.

Por fim, acredita-se que a falta de padronização dos protocolos e ainda, a falta de entendimento teórico dos mecanismos que levam aos efeitos biomoduladores do LED constituem, provavelmente, o principal fator na inconsistência de resultados. Desta forma, cabe aos pesquisadores considerar para futuros trabalhos, fatores inerentes ao modelo experimental como espécie, tipo de tecido, espessura e cor da pele, presença ou ausência de pelo, tamanho da área a ser irradiada, dentre outros, que em decorrência irão definir as características e o dispositivo a ser utilizado. Assim, considerações com relação ao equipamento também devem ser analisadas, tais como tipo de dispositivo

(LED, *laser*), potência, comprimento de onda, densidade, área, profundidade do alvo, número de aplicações e dosimetria.

É importante notar que os resultados obtidos das avaliações radiográfica, cintilografia óssea, densitometria óssea e histologia sugeriram que o uso da associação da aplicação do LED e a suplementação com *L. calcareum*, sob as condições aqui utilizadas, levaram à presença de características compatíveis com processo de consolidação óssea mais lenta (Richardson, 2000). Provavelmente, houve uma interação desfavorável entre a luz proveniente do LED e os componentes presentes no *L. calcareum*, uma vez que o LED interage com cromóforos naturais presentes no tecido (Desmet *et al.* 2006, Mikail, 2009), ou, quiçá, poder-se-ia pensar que mecanismos de ação competitivos entre os dois tratamentos interferiram no processo fisiológico de consolidação óssea. A ausência de literatura sobre o uso da associação da luz, especificamente do LED, com a suplementação mineral na reparação tecidual, impossibilita o esclarecimento dos achados deste trabalho. Futuras pesquisas poderiam ser conduzidas para estudar a interação entre a luz e o uso de fontes minerais alternativas no reparo de alterações do tecido ósseo.

CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este estudo e diante dos resultados obtidos pode-se concluir que:

O uso isolado do LED ou da suplementação com *L. calcareum* não interfere no processo de reparação óssea no organismo sadio que não necessita de fontes suplementares para a consolidação óssea.

Pela análise histológica o processo de consolidação óssea nos animais tratados pela associação da suplementação com *L. calcareum* e o LED foi mais lento sendo portanto, não indicado seu uso para tratamento de fraturas em animais sadios.

Pesquisas adicionais precisam ser conduzidas para melhor entendimento dos efeitos destas fontes alternativas para estímulo da reparação óssea e sua indicação ou contra-indicação clínica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.E. Quantitative computed tomography. *European Journal of Radiology*. v.71, p.415-424. 2009.
- AIRHART, J. C.; TAYLOR, S. J.; PURSER, K. W.; *et al.* The bioavailability in chicks of calcium in a product derived from calcified seaweed (Marigro). In: *The Southern Poultry Science Society, 23rd Annual Meeting and The Southern Conference on Avian Diseases, 43rd Annual Meeting*. S32, 2002, p.118.
- AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J. Animal Selections in Orthopaedic research. c.3 In: _____ . *Animal Models In Orthopaedic Research*. Boca Raton: CRC Press. 1999. p.39-57.
- AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J.; DRAUGHN, R.A. Animal Models of Bone Fracture or Osteotomy. c.11 In: AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J. *Animal Models In Orthopaedic Research*. Boca Raton: CRC Press. 1999. p.197-217.
- AN, Y.H. Methods of Evaluation in Orthopaedic Animal Research. c.6 In: AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J. *Animal Models In Orthopaedic Research*. Boca Raton: CRC Press. 1999. p.85-114.
- ANDLAUER, W.; FURST P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. v.35, p.171-176. 2002.
- ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. *Agro-food-Industry Hi Tech*. v.9/10, p.46-47, 1997.
- BAHK, YW. Introduction and fundamentals of pinhole scintigraphy. In: _____ . *Combined Scintigraphic and Radiographic Diagnosis of Bone and Joint Diseases*. Germany: Springer. 2000. p.7.
- BARTELS, K.E. Lasers in veterinary medicine—where have we been, and where are we going?. *Vet Clin Small Anim*. v.32, c.3, p.495-515. 2002.
- BLAS, J.C.; MATEOS, G.G. Feed Formulation. In: BLAS, C.; WISEMAN, J. *The Nutrition of the Rabbit*. UK: CABI Publishing. c.13, 1998. p.241-254.
- BRAWN, P.R.; KWONG-HING A. Histologic Comparison of Light Emitting Diode Phototherapy-Treated Hydroxyapatite-Grafted Extraction Sockets: A Same-Mouth Case Study. *Implant Dentistry*. v.16, n.2. 2007.
- BRODBELT, D. Perioperative mortality in small animal anaesthesia. *The Veterinary Journal*. v.182, p.152-161. 2009.
- Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals; Board on Agriculture and Natural Resources; Division on

- Earth and Life Studies; National Research Council. *Mineral Tolerance of animals*. 2 ed. USA: The National Academies Press. 2005. p.1-6, 97-108.
- CASALECHI, H.L.; NICOLAU, R.A.; CASALECHI, V.L.; *et al.* The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci*. DOI 10.1007/s10103-008-0607-6. 2008.
- CORAZZA, A.V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; *et al.* Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.25, n.2, p.102-106. 2007.
- DEAN, D.W.; SOUTHERN, L.L.; BIDNER, T.D. *et al.* The effect of a calcified seaweed product on growth performance, carcass traits, and meat quality in swine. In: *Abstracts American Society Of Animal Science, Midwestern Branch, American Dairy Science Association Midwest Branch*. 172, 2003, p.43.
- DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. Fracture Healing. c.1. In: _____. *A Guide to Canine and Feline Outhopaedic*. USA: Blackwell Science. 2000. p.1-17.
- DESMET, K.D.; PAZ, D.A.; CORRY, J.J. *et al.* Clínica and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.24, n.2, p.121-128. 2006.
- DIAS, G.T.M. Granulados Bioclásticos – Algas Calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*. v.18, n.3, p.301-318. 2001.
- DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*. v.71, p.1809–1840. 2004.
- DOETSCH, A.M.; FABER, J.; LYNNERUP, N.; *et al.* The effect of calcium and vitamin D3 supplementation on the healing of the proximal humerus fracture: A randomized placebo-controlled study. *Calcif. Tissue Int*. v.75, p.183-188. 2004.
- DOIGE, C. Sistema Esquelético. c.11. In: THOMSON, R.G. *Patologia Veterinária Especial*. SP: Manole. 1990. p.531-578.
- ECKELMAN, W.C.; LEVENSON, S.M. Química do Tecnécio e do Iodo. c.11. In: ROCHA, A.F.G.Da., HARVERT, J.C. *Medicina Nuclear: Bases*. RJ: Guanabara Koogan. 1979. p.145-173.
- EMANUELLI, M.P.; LOPES, S.T.A.; MACIEL, R.M.; *et al.* Concentração Sérica de Fosfatase Alcalina, Gama-Glutamil Transferase, Uréia e Creatinina em Coelho (Oryctolagus cuniculus). *Ciência Animal Brasileira*. v.9, n.1, p.251-255. 2008.
- ENWEMEKA, C.S. The Place of Coherence in Light Induced Tissue Repair and Pain Modulation. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.24, n.4, p.457. 2006.
- EULER, A.C.C. *Utilização digestiva, metodologias de avaliação in vitro de dietas e caracterização da microbiota cecal em coelhos suplementados com Lithothamnium*. 2009. 78f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- EURELL, J.A.C.; VAN SICKLE, D.C. Connective and supportive tissues. c.3. In: EURELL J.A.; FRAPPIER, B.L. *Delhmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6ed. Australia: Blackwell Publishing. 2006. p.31-60.
- FLECKNELL, P. *Laboratory Animal Anesthesia*. 3ed. USA: Elsevier Inc. 2009. p.15-18, .
- GRUBER, H.E.; STASKY, A.A. Histological Study in Orthopaedic Animal Research. c.7. In: AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J. *Animal Models In Orthopaedic Research*. Boca Raton: CRC Press. 1999. p.115-131.
- GUZZARDELLA, G.A.; TORRICELLI, P.; NICOLI-ALDINI, N.; *et al.* Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an *in vivo* comparative study. *Clin. Oral Impl. Res*. v.14, p.226–232. 2003.
- HANKENSON, K.D.; CAVALIERE, C.M.; FRANK, R.P. Animals Models of Skeletal Disease. c.10. In: HAU, J. VAN HOOSIER, G.L. *Handbook of Laboratory Animal Science*. 2ed. v.2. Washington: CRC Press. 2003. p.183-224.

- HARCOURT-BROWN, F. *Textbook of Rabbit Medicine*. USA: Elsevier Science Limited. 2002.
- HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. *Biología e Manejo*. In: _____. *Biología e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3ed. São Paulo: Roca. 1993. 11p.
- HAZEWINKEL, H.A.W. Skeletal Disease. c.22. In: WILLS, J.M. and SIMPSON, K.W. *The Waltham Book of Clinical Nutrition of the Dog and Cat*. Great Britain: Pergamon. 1994. p.395-423.
- HUANG, P.-J.; HUANG, Y.-C.; SU, M.-F.; *et al.* *In Vitro* Observations on the Influence of Copper Peptide Aids for the LED Photoirradiation of Fibroblast Collagen Synthesis. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.25, n.3, p.183-190. 2007.
- HUGHES, S. Radionuclides In Orthopaedic Surgery. *The journal of bone and Joint Surgery*. v.62, n.2, p.141-150. 1980.
- HUNGRIA, J.S. Consolidação Ossea. s.17, c.85 Em: COHEN, M.; MATTAR Jr., R. e GARCIA, R.J. *Tratado de ortopedia*. São Paulo: Roca. 2007. p.623-626.
- ILICH, J.Z.; KERSTETTER, J.E. Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium. *Am J Clin Nutr*. v.19, n.6, p.715-737. 2000.
- JENKINS, J.R. Gastrointestinal Diseases. c.17. In: QUENSENBERRY, H. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. USA: Saunders Company. 1997. p.176-188.
- KADERLY, R.E. Primary Bone Healing. *Semin Vet Med Surg (Small Animal)*. v.6, n.1, p.21-25. 1991.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Appendix I and IX. In: _____. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6ed. San Diego: Academic Press. 2008. p.890-891.
- KARU, T.I. Laser Bioestimulation: a Photobiological phenomenon. *J. Photochem. Photobiol. Biol*. v.3, p.638-640. 1989.
- KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KOLYAKOV S.F.; *et al.* Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J. Photochem. Photobiol. Biol*. v.81, p.98-106. 2005.
- KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. Biol*. v.49, p.1-17. 1999.
- KHADRA, M.; KASEM, N.; HAANÆS, H.R.; *et al.* Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. v.97, p.693-700. 2004.
- KIM, H.K.; KIM, J. H.; ABBAS, A.A.; *et al.* Red light of 647 nm Enhances Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Lasers Med Sci*. 2008.
- LEBLANC, A.K.; DANIEL, G.B. Advanced Imaging for Veterinary Cancer Patients. *Vet Clin Small Anim*. v.37, c.6, p. 1059–1077. 2007.
- LIPMAN, N.S.; MARINI, R.P.; FLECKNELLIN, P.A. Anesthesia and Analgesia in Rabbits. c.11. In: FISH, R.; DANNEMAN, P.J.; BROWN, M.; *et al.* *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2ed. USA: American College of Laboratory Animal Medicine. 2008. p.299-333.
- LIU, X.; LYON, R.; MEIER, H.T.; *et al.* Effect of Lower-Level Laser Therapy on Rabbit Tibial Fracture. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.25, n.6, p.487-494. 2007.
- LOPES, C.B.; PACHECO, M.T.T.; SILVEIRA JR, L. *et al.* The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v.89, p.125–130. 2007.
- LOPEZ-BEN, R.; MOORE, D.S.; THORNTON, D.D. Musculoskeletal System. In: LEE, J.K.T.; SAGEL, S.S.; STANLEY, R.J.; *et al.* *Computed Body Tomography with MRI Correlation*. 4ed USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 1482-1488, 1640-1643p.

- LOPEZ-BENITO, M. Estudio de la composición química del *Lithothamnium calcareum* (Aresch) y su aplicación como corrector de terrenos de cultivo. *Inv. Pesq.* v.23, p. 53-70. 1963.
- MADER, D.R. Basic Approach to Veterinary Care. c.15 In: QUENSENBERRY, H. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. USA: Saunders Company. 1997. p.160-168.
- MALINOVSKY, J.M.; BERNARD, J.M.; BAUDRIMONT, M., *et al.* A chronic model for experimental investigation of epidural anesthesia in the rabbit. *Reg Anesth.* v.22, c.1, p.80-85. 1997.
- MALINOVSKY, J.M.; CORRE, P.L.; MEUNIER, J.F.; *et al.* A dose-response study of epidural liposomal bupivacaine in rabbits. *Journal of Controlled Release.* v.60, c.1, p.111-119. 1999.
- MASON, D.E. Anesthesia, Analgesia, and Sedation for Small Mammals. In: QUENSENBERRY, H. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. USA: Saunders Company. 1997. 382,384-385p.
- MATEOS, G.G.; BLAS, J.C. Minerals, Vitamins and Additives. In: BLAS, C.; WISEMAN, J. *The Nutrition of the Rabbit*. UK: CABI Publishing. c.9, 1998. p.145-175.
- MATIN, P. The Appearance of Bone Scans Following Fractures, Including Immediate and Long-Term Studies. *J Nucl Med.* v.20, n.12, p.1227-1231. 1979.
- MATSUZAKA, K.; OHTA, K.; TAKAHASHI, K.; *et al.* Effect of a diode laser on cell proliferation, alkaline phosphatase activity, and osteopontin mRNA expression in proliferating and in differentiating osteoblastic cells. *Biomedical Research.* v.25, n.4, p.165-170. 2004.
- McDOWELL, L.R. Calcium and Phosphorus. c.2. In: _____ *Minerals in Animal and Human Nutrition*. USA: Academic Press Inc. 1992. p.26-77.
- MELILLO, A. Rabbit Clinical Pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine.* v.16, n.3, p.135-145. 2007.
- MELO, T.V.; FERREIRA, R.A.; CARNEIRO, J.B.A.; *et al.* Rendimiento de codornices japonesas utilizando harina de algas marinas y fosfato monoamónico. *Arch. Zootec.* v.57, n.219, p.381-384. 2008.
- MELO, T.V.; MENDONÇA, P.P.; MOURA, A.M.A.; *et al.* Solubilidade *in vitro* de algunas fuentes de calcio utilizadas en alimentación animal. *Arch. Zootec.* v.55, n.211, p.297-300. 2006.
- MELO, T.V.; MOURA, A.M.A. Utilização Da Farinha De Algas Calcáreas Na Alimentação Animal. *Arch. Zootec.* v.58, p.99-107. 2009.
- MIKAIL, S. Laser Terapêutico. c.11. In: PEDRO, C.R.; MIKAIL, S. *Fisioterapia Veterinária*. 2ed. São Paulo: Manole. 2009. p.89-97.
- MILLIS, D.L.; FRANCIS, D.; ADAMSON, C. Emerging Modalities in Veterinary Rehabilitation. *Vet Clin Small Anim.* v.35, c.5, p.1335-1355. 2005.
- MIRELL, S. Tomografia Computadorizada. In: ROCHA, A.F.G. e HARBERT, J.C. *Medicina Nuclear - Bases*. RJ: Guanabara Koogan. 1979. p.243-255.
- MORAIS, G.Q.; BURGOS, M.G.P.A. Impactos dos nutrientes na saúde óssea. *Revi Bras Ortop.* v.42, n7, p.189-194. 2007.
- MUÑIZ S.H.; CASANOVAS, M.M. *Introducción a la Tomografía Computarizada*. *Rev Esp Med Nucl.* v.25, n.3, p.206-216. 2006.
- NEUMANN, M.; FRIEDMANN, J.; ROY, M.A.; *et al.* Provision of High-Protein Supplement for Patients Recovering From Hip Fracture. *Nutrition.* v.20, n.5, p.415-419. 2004.
- NORRIS, S.A.; PETTIFOR, J.M.; GRAY D.A.; *et al.* Calcium Metabolism and Bone Mass in Female Rabbits During Skeletal Maturation: Effects of Dietary Calcium Intake. *Bone.* v.29, n.1, p.62-69. 2001.

- NUTTON, R.W.; FITZGERALD, R.H.; and KELLY, P.J. Early Dynamic Bone-Imaging as an Indicator of Osseous Blood Flow and Factors Affecting the Uptake of ^{99m}Tc Hydroxymethylene Diphosphonate in Healing Bone. *J Bone Joint Surg Am.* v.67, n.5, p.763-770. 1985.
- OLIVEIRA, D.A.A.P.; OLIVEIRA, R.F.; ZANGARO, R.A. *et al.* Evaluation of Low-Level Laser Therapy of Osteoblastic Cells. *Photomedicine and Laser Surgery.* v.26, n.4, p.401-404. 2008.
- ORSINE, G.F.; COSTA, C.P.; OLIVEIRA, B; *et al.* Efeito da fonte de cálcio (Calcário Vs *Lithothamnium calcareum*) na digestibilidade aprende do feno de capim *Brachiaria decumbens* Stach cv. Basiliski. *Anais Esc. Agron. e Vet.* v.19, p.49-58. 1989.
- ÖZTÜRK, A.; ILMAN, A.A.; SAGLAM, H.; *et al.* The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery.* v.14, n.1, p.21-27. 2008.
- PALHARES, M.C.; MELO, U.P.; FERREIRA, C. *et al.* Tratamento Conservativo de Fratura Ulnar em Equino: Relato de Caso. In: 8ª CONFERENCIA SULAMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Anclivepa-RJ. 2008.
- PELÍCIA, K.; GARCIA, E.A.; SCHERER, M.R.S.; *et al.* Alternative Calcium Source Effects on Commercial Egg Production and Quality. *Brazilian Journal of Poultry Science.* v.9, n.2, p.105-109. 2007.
- PERCY, D.H.; BARTHOLD, S.W. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. 3ed. USA: Blackwell Publishing. 2007. p.298,300.
- PERUMAL, V.; ROBERTS C.S. Factors contributing to non-union of fractures. *Current Orthopaedics.* v.21, p.258-261. 2007.
- PIERMATTEI, D.L. *An Atlas of Surgical Approaches of the Bones and Joints of the Dog and Cat.* Philadelphia: Saunders Company. 1993. 298-300p.
- PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E.M.M. Photoengineering of Bone Repair Processes. *Photomedicine and Laser Surgery.* v.24, n.2, p.169-178. 2006.
- PÖNTINEN, P.J.; AALTOKALLIO, T.; KOLARI P.J. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. *Acupunct Electrother Res.* v.21, c.2, p.105-118. 1996.
- POPE, H. R. ; OWENS, C.M.; CAVITT L.C.; *et al.* Efficacy of Marigro in Supporting Growth, Carcass Yield and Meat Quality of Broilers. In: *The Southern Poultry Science Society, 23rd Annual Meeting and The Southern Conference on Avian Diseases, 43rd Annual Meeting.* S108, 2002, p.135.
- POPESKO, P.; RAJTOVA, V.; HORAK, J. *A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals* v.2. London: Wolfe, 1992, 126,130,142p.
- QUEIROGA, A.S.; SOUSA, F.B.; ARAÚJO, J.M.S. *et al.* Evaluation of Bone Repair in the Femur of Rats Submitted to Laser Therapy in Different Wavelengths: An Image Segmentation Method of Analysis. *Laser Physics.* v.18, n.9, p.1087-1091. 2008
- REDROBE, S. Calcium Metabolism in Rabbit. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* v.11, n.2, p.94-101. 2006.
- RICH, G.A. Rabbit Orthopedic Surgery. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice.* v.5, n.1, p.157-168. 2002.
- RICHARDSON, V.C.G. Anesthesia and Surgery. c.16, In: _____. *Rabbits: health, husbandry and diseases.* Oxford: Blackwell Science Ltd. 2000. p.151-157.
- RIJK, P.C.; VAN ECK-SMIT, B.L. F.; VAN-NOORDEN, C.J. F. Scintigraphic Assessment of Rabbit Knee Joints After Meniscal Allograft Transplantation. *Journal of Arthroscopic and Related Surgery.* v.19, n.5, p.506-510. 2003.
- ROCHA, A.F.G.; HARVERT, J.C. Sistema Esquelético. c.3. In: _____. *Medicina*

- Nuclear - Aplicações Clínicas*. RJ: Guanabara Koogan. 1979. p.86-99.
- REUSCH, B. Rabbit Gastroenterology. *Vet Clin Exot Anim*. v.8, p.351–375. 2005.
- SAHA, G.P. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 5th ed. New York: Springer. 2004. 5-383p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Zootecnia e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 221p.
- SAMUELSON, D.A. Cartilage and Bone. c.6. In: _____. *Textbook of Veterinary Histology*. China: Saunders Elsevier. 2007. p.100-129.
- SCHELLING, S.H. Secondary (Classical) Bone Healing. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. v.6, n.1, p.16-20. 1991.
- SCHINDELER, A.; McDONALD, M.M.; BOKKO, P.; *et al.* Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v.19, p.459–466. 2008.
- SCHWOCHAU, K. *Technetium: Chemistry and radiopharmaceutical applications*. Weinheim – Germany: Wiley-VCH. 2000. 4,36,39,397p.
- SHANI, J.; AMIR, W.D.; SOSKOLNE, A.; *et al.* Correlations Between Uptake of Technetium, Calcium, Phosphate, and Mineralization in Rat Tibial Bone Repair. *J Nucl Med*. v.31, p.2011-2014. 1990.
- SMITH, K.C. The Photobiological Basis of Low-Level Laser Radiation Therapy. *Laser Ther*. v.3, p.19–24. 1991.
- STAHL, F.; ASHWORTH, S.H.; KLAUS, JANDT, D. *et al.* Light-emitting diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. *Biomaterials*. v.21, p.1379-1385. 2000.
- TEIXEIRA, R.G. *Avaliação da farinha de algas marinhas (Lithothamnium calcareum) como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães*. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- THOMAS, C. RICHTER, G.W. *Sandritter's Color Atlas and Textbook of Histopathology*. 7 ed. Chicago: Year Book Medical Publishers Inc. 1984. p.251–255.
- THRALL, J.H.; ZIESSMAN, H.A. Sistema Esquelético. c.6, 2ed. In: _____. *Medicina Nuclear*. Brasil: Guanabara Koogan. 2003, p.111-143.
- VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. v.18, p.95–99. 2003.
- VINCK, E.; COOREVITS, P.; CAGNIE, B.; *et al.* Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. *Lasers in Medical Science*. v.20, p.35–40. 2005.
- WEBB, J.C.J.; TRICKER, J. Bone Biology. A review of fracture healing. *Current Orthopaedics*. v.14, p.457–463. 2000.
- WHELAN, H.T.; SMITS, JR. R.L.; BUCHMAN, E.V.; *et al.* Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. v.19, n.6, p.305–314. 2001.
- WILSON, J.W. Vascular Supply to Normal Bone and Healing Fracture. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. v.6, n.1, p.26-38. 1991.
- ZHOU, Y.; JIANG, T.; QIAN, M.; *et al.* Roles of bone scintigraphy and resonance frequency analysis in evaluating osseointegration of endosseous implant. *Biomaterials*. n.29, p.461–474. 2008.