

Jessica Alejandra Castro Varon

**BIOCERÂMICA DE HIDROXIAPATITA E TRIFOSFATOS DE CÁLCIO DE
ABSORÇÕES RÁPIDA E LENTA NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM
RATAS WISTAR COM OU SEM OSTEOPENIA INDUZIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal

Área: Medicina e Cirurgia Veterinária
Estudo clínico-cirúrgico e de métodos terapêuticos e
de diagnóstico

Orientadora: Prof^a. Dra. Cleuza Maria de Faria Rezende

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2017

Castro Varon, Jessica Alejandra, 1988-

C355b Biocerâmica de hidroxiapatita e trifosfatos de cálcio de absorções rápida e lenta no preparo de defeitos ósseos em ratas Wistar com e sem osteopenia induzida/ Jessica Alejandra Castro Varon. – 2017.
61 p.: il.

Orientadora: Cleuza Maria de Faria Rezende
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Animais de laboratório – Cirurgia – Teses. 2. Fosfatase alcalina – Teses. 3. Ossos – Substitutos – Teses. I. Rezende, Cleuza Maria de Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 7

FOLHA DE APROVAÇÃO

JESSICA ALEJANDRA CASTRO VARON

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 29 de Novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



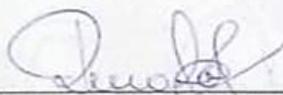
Prof^ª. Cleuza Maria de Faria Rezende
Presidente - Orientador



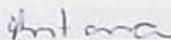
Prof^ª. Marlene Isabel Vargas Vitoria
Universidade Federal de Viçosa - UFV



Prof^ª. Andréa Pacheco Batista Borges
Universidade Federal de Viçosa - UFV



Prof. Renato Cesar Sacchetto Tôres
Escola de Veterinária - UFMG



Prof^ª. Gilcinéa de Cássia Santana
Escola de Veterinária - UFMG

Agradecimentos

A meus pais que tem me oferecido as ferramentas adequadas para meu crescimento ao longo da minha vida e ser a pessoa que sou hoje, seus ensinamentos e carinho. A meus pais e irmão Felipe, pelo apoio incondicional sempre presentes, mesmo distantes.

À professora Cleuza, pela paciência no meu aprendizado nestes oito anos desde o momento em que cheguei no Brasil, pelos ensinamentos e orientação em tudo momento. Por ser o exemplo e referencia de profissionalismo e ética pelo qual trabalho todos os dias.

Ao Hospital veterinário, a equipe de enfermeiros especialmente a Urlem, Adriana, Udi, Juliana e Aline que me ajudaram sempre oportunamente nos momentos importantes.

Ao laboratório de Histopatológica da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente a Natalia e Leymar que me ajudaram em todo momento.

À equipe cirúrgica, a Barbara, Esteban, Santiago e Adriano, sem eles teria sido impossível o sucesso no experimento.

A todo o pessoal da Escola de Veterinária e do Hospital da UFMG, por toda a ajuda, colaboração e apoio nesses anos no Brasil.

A meus irmãos de coração minha eterna gratidão e amizade, Luisa e Gabriel que sempre estiveram comigo nos momentos mais difíceis, me dando apoio e força, sempre incondicionais.

A Layon por me dar apoio e animo sempre para seguir adiante e lutar até ultimo momento quando não parecia dar certo. Por sua parceria incondicional.

Ao Laboratório da Sistemática Vegetal pela ajuda com os equipamentos, microscópio, estereoscópio e sistema de fotografia para a toma de imagens histológicas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos de 2013 até janeiro de 2017.

Ao laboratório Einco pelo fornecimento do material utilizado no estudo.

Sumario

BIOCERÂMICA DE HIDROXIAPATITA E TRIFOSFATOS DE CÁLCIO DE ABSORÇÕES RÁPIDA E LENTA NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM RATAS WISTAR COM OU SEM OSTEOPENIA INDUZIDA

RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO GERAL.....	14

1. CAPÍTULO I

<i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	16
-------------------------------------	-----------

1.1. PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA, ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS.....	16
1.2. ENXERTOS.....	18
1.3. OSTEOPOROSE.....	18
1.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS ÓSSEOS.....	20
1.4.1. FOSFATASE ALCALINA.....	20
1.4.2. OSTEOCALCINA.....	21
1.5. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE RADIOGRÁFICA.....	22

2. CAPITULO II **23**

<i>OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA ASSOCIADA A DIETA HIPOCALCÊMICA COMO MODELO PARA INDUÇÃO RÁPIDA DE OSTEOPENIA</i>	23
---	-----------

RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24

2.1. INTRODUÇÃO.....	25
2.2. OBJETIVOS.....	26
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.3.1. PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA OSTEOPENIA.....	26
2.3.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	27
2.3.3. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E DE DENSIDADE ÓSSEA.....	28
2.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30

2.4. RESULTADOS.....	30
2.4.1. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	30
2.4.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E DE DENSIDADE ÓSSEA.....	32
2.5. DISCUSSÃO.....	34
2.6. CONCLUSÕES.....	37

3. CAPITULO III

BIOCERÂMICA DE HIDROXIAPATITA E TRIFOSFATOS DE CÁLCIO DE ABSORÇÃO RÁPIDA E LENTA NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO EM RATAS COM OU SEM OSTEOPENIA INDUZIDA	38
--	-----------

RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	39

3.1. INTRODUÇÃO.....	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.2.1. PRIMEIRA FASE: OSTEOPENIA EXPERIMENTAL.....	42
3.2.2. SEGUNDA FASE: IMPLANTAÇÃO DA BIOCERÂMICA EM GRÂNULOS.....	42
3.2.3. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRÁFICA.....	44
3.2.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	45
3.3. RESULTADOS.....	46
3.3.1. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	46
3.3.2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	49
3.4. DISCUSSÃO.....	53
3.5. CONCLUSÕES.....	54
3.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
-----------------------------------	-----------

Lista de Figuras

- Figura 1** - Coleta de sangue. A) Anestesia com emprego de máscara. B) Posição em decúbito lateral para coleta de sangue. C) Localização anatômica da veia caudal da rata. D) Coleta da sangue da veia caudal da rata com emprego de cateter endovenoso 24 G.28
- Figura 2** - Ilustração da avaliação da densidade radiográfica com auxílio do programa Image J. Determinação da área de interesse (seta vermelha). Histograma com valores de avaliação: tamanho da área, média, valor máximo, valor mínimo e desvio padrão da área de interesse (quadro vermelho). Determinação da área de referência ou controle na escala de alumínio (seta amarela). ...29
- Figura 3** - Níveis de osteocalcina total no soro dos diferentes grupos experimentais em ratas wistar, nos três tempos de avaliação. Observa-se aumento significativo da osteocalcina sérica no grupo OSH quando comparado ao controle. (*estatisticamente significante, $p < 0,05$).31
- Figura 4** - Avaliação da fosfatase alcalina total (FA) no soro de ratas submetidas ou não a OSH. Observa-se aumento significativo da FA sérica no grupo OSH aos 30 dias (*estatisticamente significante, $p < 0,05$).32
- Figura 5** - Densidade radiográfica em pixels, da área de controle dos raios x de todos os animais. Observa-se que não houve diferença significativa na média de pixels entre os grupos comparados.33
- Figura 6** - Densidade radiográfica em pixels nos três tempos de avaliação: zero, 15 e 30 dias pós-cirúrgico, grupo OSH e grupo controle. Observa-se no grupo OSH diminuição significativa da média de pixels quando comparado com o controle.33
- Figura 7** - Diagrama do desenho experimental.....42
- Figura 8** - Procedimento cirúrgico em ratas wistar. A) Criação de falha óssea com auxílio de uma broca e furadeira pneumática sob irrigação contínua com solução de cloreto de sódio 0,9 % estéril. B) Defeito no terço proximal da tibia. C) Preenchimento com biocerâmica β HA/TCP de absorção rápida e lenta. D) Demorrafia após criação de defeito nos membros pélvicos.44
- Figura 9** - Projeção radiográfica médio- lateral da tibia de rata wistar após a criação de defeito ósseo no terço proximal da tibia.45
- Figura 10** - Densidade óssea radiográfica em ratas wistar nos grupos defeito vazio aos zero e 15 dias após criação do defeito na tibia proximal.....47
- Figura 11** - Projeção radiográfica de ratas wistar após implantação da biocerâmica HA/TPC de absorções rápida e lenta. Grupo controle não submetido a OSH com biocerâmica de absorção lenta (A) e rápida (B). Grupo OSH com biocerâmica de absorção lenta (C) e rápida (D).....47

Figura 12 - Densidade óssea radiográfica em ratas wistar com e sem osteopenia induzida aos zero e 15 dias após implantação de biocerâmica de absorções lenta e rápida48

Figura 13 - Fotomicrografia da epífise tibial de ratas wistar aos 15 (A,B) e 30 dias (C,D) após criação de defeito ósseo no terço proximal da tibia. Presença de trabéculas espessas e confluentes demonstrando o estado normal do osso no grupo controle (A,C). Grupo OSH com intensa redução de trabéculas com adelgaçamento e fragmentação das mesmas, e cobertura osteoblástica diminuída (setas) característico no processo de osteopenia (B,D) (HE; 5X).49

Figura 14 - Fotomicrografia de defeito ósseo no terço proximal da tibia em ratas wistar submetidas a OSH e dieta hipocalcêmica após 15 e 30 dias da implantação de biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, D, G, J) e lenta (B, E, H, K). Observa-se grande quantidade de tecido osteóide em todos os grupos. Tecido osteóide e formação de trabéculas (estrela) em volta e no interior dos grânulos da biocerâmica (triângulo). No grupo controle, defeito vazio (C, F, I, L) a formação de uma cortical fina ainda não completa a partir do osso preexistente (setas vermelhas) (HE- 3.2 X, 20X). Observa-se na biocerâmica de absorção rápida aos 30 dias, neoformação mais organizada tendendo a continuidade cortical (G- aspa vermelha) e na biocerâmica de absorção lenta uma neoformação com retração em direção ao canal medular (H- seta azul).51

Figura 15 - Fotomicrografia de defeito ósseo no terço proximal da tibia em ratas wistar grupo controle, não castradas e alimentadas com dieta comercial após 15 e 30 dias da implantação de biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, D, G, J) e lenta (B, E, H, K). Observa-se grande quantidade de tecido osteóide em todos os grupos. Tecido osteóide e formação de trabéculas (estrela) em volta e no interior dos grânulos da biocerâmica (triângulo azul). No grupo controle a formação de uma cortical muito fina ainda não completa a partir do osso preexistente aos 15 dias e a formação de uma cortical fina em alguns lugares aos 30 dias (setas vermelhas) (HE, 3.2 X, 20X).52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos níveis de OC no soro (ng/ml) em ratas wistar castradas e não castradas nos três tempos de avaliação	31
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos níveis de FA no soro (U/L) em ratas wistar castradas e não castradas nos três tempos de avaliação.	32
Tabela 3 - Densidade radiográfica (pixels) em ratas castradas e não castradas nos três tempos de avaliação	34
Tabela 4 - Densidade radiográfica em pixel de ratas castradas e não castradas aos 0, 15 e 30 dias de avaliação.	46
Tabela 5 - Densidade óssea radiográfica em ratas wistar nos grupos defeito vazio aos zero e 15 dias após criação de defeito em tíbia proximal.	47

Lista de Abreviações

β HA/TCP: beta hidroxiapatita e trifosfatos de calcio

Ca: Cálcio

FA: Fosfatase alcalina

FGF: fator de crescimento fibroblástico

HA: Hidroxiapatita

HE: Hematoxilina- Eosina

IL: Interleucina

OC: Osteocalcina

OSH: Ovariosalpingohisterectomia

OVH: Ovariohistectomia

P: Fosforo

PDGF: Fatores de crescimento derivado

TCP: Trifosfatos de cálcio

TNF-α: Fator de necrose tumoral-α

TGF: ator de crescimento transformador

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do substituto ósseo β HA/TCP de absorções rápida e lenta na reparação óssea de ratas com ou sem osteopenia induzida. O projeto foi desenvolvido em duas etapas: indução da osteopenia (Capítulo I) e implantação do biomaterial (Capítulo II). Na fase de indução da osteopenia foram utilizadas 18 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corporal média de 300 gramas e seis meses de idade. A osteopenia foi induzida por ovariosalpingohisterectomia associada a dieta hipocalcêmica e foi avaliada por densidade radiográfica óssea e mensuração de marcadores bioquímicos fosfatase alcalina e osteocalcina. Em todas as ratas verificou-se aumento dos níveis séricos de FA e OC e redução da densidade radiográfica óssea, caracterizando a condição osteopênica. Na segunda fase do projeto foram utilizadas 36 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corporal média de 300 gramas e seis meses de idade. As ratas foram divididas em dois grupos: animais submetidos a ovariectomia e dieta hipocalcêmica (Grupo OSH) e animais não castrados com dieta comercial (Grupo Controle). Após a confirmação da indução osteopênica por meio de densidade radiográfica óssea no grupo OSH, foi criado um defeito ósseo no terço proximal das tíbias direita e esquerda em todos os animais. Estes foram subdivididos em dois grupos: tratados com preenchimento do defeito com β HA/TCP de absorções rápida e lenta e grupo controle negativo no qual o defeito permaneceu vazio. Foram feitas avaliações radiográficas nos dias 0, 15 e 30 após implante e avaliações histológicas aos 15 e 30 dias. Foram observadas formação de redes vasculares, tecido osteóide e matriz óssea em todos os grupos tratados com β HA/TCP rápida e lenta, favorecendo o processo de reparação; nos grupos controle negativos foi observada a formação de cortical fina e descontínua a partir do osso preexistente. A β HA/TCP de absorções rápida e lenta é um biomaterial ideal no tratamento de falhas ósseas promovendo a regeneração. A β HA/TCP de absorção rápida mostrou-se um material promissor no reparo de falhas ósseas com uma neoformação mais organizada.

Palavras chaves: osteopenia, osteocalcina, fosfatase alcalina, densidade radiográfica.

ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the effect of the fast and slow absorptions of β / HA bone substitute on bone repair of rats with or without induced osteopenia. The project was developed in two stages: induction of osteopenia (Chapter I) and implantation of the biomaterial (Chapter II). In the osteopenia induction phase, 18 Wistar (*Rattus norvegicus*) albino rats with a mean body mass of 300 grams and 6 months of age were used. Osteopenia was induced by ovariectomized rats associated with a hypocalcemic diet and was evaluated by radiographic bone density and measurement of biochemical markers alkaline phosphatase and osteocalcin. In all rats there was an increase in serum levels of FA and OC and reduction of bone radiographic density, characterizing the osteopenic condition. In the second phase of the project, 36 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with average body mass of 300 grams and six months of age were used. The rats were divided into two groups: animals submitted to ovariectomy and hypocalcemic diet (OSH Group) and uncastrated animals with commercial diet (Control Group). After confirming the osteopenic induction by means of bone radiographic density in the OSH group, a bone defect was created in the proximal third of the right and left tibias in all the animals. These were subdivided into two groups: treated with defect filling with fast and slow absorption β / HA / TCP and negative control group in which the defect remained empty. Radiographic evaluations were performed on days 0, 15 and 30 after implantation and histological evaluations at 15 and 30 days. Formation of vascular networks, osteoid tissue and bone matrix were observed in all groups treated with fast and slow β HA / TCP, favoring the repair process; in the negative control groups, fine and discontinuous cortical formation was observed from the preexisting bone. The rapid and slow absorption of β / HA is an ideal biomaterial in the treatment of bone failure promoting regeneration. Fast-absorbing β -HA / TCP proved to be a promising material for repairing bone defects with a more organized neoformation.*

Keywords: *osteopenia, osteocalcin, alkaline phosphatase, radiographic density.*

INTRODUÇÃO GERAL

O tecido ósseo tem como função dar suporte aos tecidos adjacentes, proteger os órgãos vitais e medula óssea, sustentar os músculos esqueléticos e armazenar cálcio e fósforo. Apresenta tecido conjuntivo e células especializadas como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos e também matriz extracelular (Junqueira e Carneiro, 2008). Em algumas condições especiais o equilíbrio entre estes componentes se encontra alterado ocasionando distúrbios no tecido ósseo que podem favorecer as fraturas. Fraturas, complicações no processo de consolidação, perdas ósseas de grande proporção são algumas das situações encontradas no dia a dia tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (Castro-Varon, 2013). Uma situação específica mais frequente no homem, que representa grande desafio para a ortopedia é a presença de osteoporose na qual se observa um desequilíbrio na homeostasia óssea por idade avançada, alterações hormonais ou supressão hormonal pós-menopausa (García-Denche, 2006).

As pesquisas relacionadas com osteopenia/osteoporose têm aumentado ao longo dos anos devido às complicações no tratamento ortopédico em geral, constituindo-se um problema de saúde pública de grande relevância. Isto tem levado ao desenvolvimento de pesquisas com alternativas diagnósticas e terapêuticas variadas na tentativa de reverter ou auxiliar na regeneração óssea. Exames rotineiros de laboratório e de imagem são as ferramentas utilizadas para o diagnóstico dessa condição clínica. Dentre estas alternativas tem-se os marcadores bioquímicos relacionados com a atividade óssea que podem propiciar maior entendimento dos mecanismos desta afecção ou doença (Delmas, 2001; Allen, 2003; García-Denche, 2006).

Uma das linhas de pesquisa direcionadas para o estudo da melhoria da qualidade óssea, que favorece a consolidação de fraturas e osteointegração de próteses é o desenvolvimento de biomateriais que possam suprir as necessidades locais. A biocerâmica de trifosfatos de cálcio e hidroxiapatita tem se mostrado um material promissor no tratamento de reparação óssea seja de pequena ou de grande proporção. A estrutura físico-química do biomaterial é um fator importante no processo de reparação óssea. A HA/ β TCP formada de fosfatos de cálcio e hidroxiapatita, com porosidade apropriada, apresenta uma granulometria variada e não apresenta alteração das características físico-químicas quando implantada no organismo até ocorrer a formação óssea desejável e necessária, atuando, portanto, como arcabouço para o crescimento celular (Garrido et al., 2011; Aristizabal, 2013; Castro-Varon, 2013). A β HA/TCP tem características de absorções variadas sem alterar suas propriedades osteocondutivas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da β HA/TCP de absorção rápida e lenta em defeitos ósseos no terço proximal de tíbias em ratas com ou sem osteopenia induzida, por meio de densidade radiográfica óssea e avaliação histológica.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a biocerâmica β HA/TCP de absorções rápida e lenta em animais com ou sem osteopenia induzida.

Avaliar por meio de densidade óssea radiográfica a condição osteopênica em ratas wistar submetidas a ovariosalpingohisterectomia associada a dieta hipocalcêmica.

Avaliar o comportamento dos marcadores bioquímicos osteocalcina e fosfatase alcalina em ratas com osteopenia experimental.

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA, ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS

O osso apresenta elevado potencial de reparação por meio de um processo dinâmico de remodelação que envolve a formação de tecido novo e a reabsorção óssea, caracterizando a total ausência de cicatriz (Serra e Silva et al., 2006; Ochandiano, 2007; Castro-Varon, 2013). Embora existam muitos estudos para se compreender o processo de regeneração óssea, sobretudo os eventos anatômicos e bioquímicos continuam sendo estudados de forma mais detalhada (Marsell e Einhorn, 2011). O osso tem capacidade para regeneração em resposta a uma lesão ou tratamento cirúrgico. Ambos os processos envolvem complexa integração de células, fatores de crescimento e matriz extracelular. O processo de reparação consiste em restaurar a continuidade dos tecidos lesados, sem necessariamente aumentar o volume ósseo (Al-Aql et al., 2008; Santos, 2011) e a regeneração é um processo que envolve a diferenciação de novas células e a formação de novo tecido ósseo que resulta em aumento do volume total de novos tecidos esqueléticos (Al-Aql et al., 2008). Os processos biológicos são controlados por mecanismos moleculares complexos que envolvem fatores locais e sistêmicos, que interagem com muitos tipos de células recrutadas dos tecidos adjacentes e da circulação (Al-Aql et al., 2008).

No momento de uma lesão óssea inicial (fratura, osteotomia) ocorre ruptura dos vasos sanguíneos, liberação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) e a formação imediata de um coágulo de fibrina após a cascata de coagulação e vasoconstrição. No coágulo os produtos de degradação resultantes da necrose das bordas da fratura e os fatores de crescimento, atraem células polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), linfócitos e monócitos que iniciam a fagocitose dos produtos de necrose (Glowacki, 1998; García-Denche, 2006; Castro-Varon, 2013). A resposta inicial resulta na secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina (IL), IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18 por macrófagos, células inflamatórias e células de origem mesenquimais (Gerstenfeld et al., 2003), aumentando assim o recrutamento de células inflamatórias que favorecem a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese. O pico de concentração dessas citocinas pode ser observado em 24 horas e retornam aos valores normais dentro de 72 horas após o trauma (Gerstenfeld et al., 2003). Durante este período o TNF- α é expresso por macrófagos e outras células inflamatórias, e acredita-se que esta expressão seja mediada pela indução de sinais inflamatórios secundários que atuam como agentes quimiotáticos para recrutar células necessárias (Kon et al., 2001). Os fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador (TGF) liberados na fase inicial da inflamação, induzem a expressão de outros fatores como o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que

promoverão a angiogênese pela migração e proliferação de células endoteliais e seus precursores (Glowacki, 1998; García-Denche, 2006).

A proporção das células mesenquimais indiferenciadas presentes nos canais ósseos, endóstio, perióstio e medula óssea é variável ao longo da vida. Estas células podem chegar ao foco da fratura a partir do perióstio, da medula óssea e do sangue. Ocorre neovascularização, vários tipos de colágeno formam uma nova rede e surgem outras células como fibroblastos, linfócitos, monócitos e macrófagos, aumentando também a proporção de células mesenquimais indiferenciadas (Glowacki, 1998; Castro-Varon, 2013). O ciclo celular de qualquer célula progenitora segue quatro etapas de comportamento (Muschler e Midura, 2002; Molina, 2008) denominadas ativação, proliferação, migração e diferenciação.

Ativação é a saída do estado quiescente das células mesenquimais indiferenciadas pela ação dos fatores reguladores; proliferação decorre dos fatores mitogênicos; migração é facilitada por diferentes fatores reguladores e influenciada por fatores da matriz extracelular; a diferenciação é a progressão em que aparecem as diferenças morfológicas e moleculares específicas da linhagem, terminando na diferenciação celular que uma vez formado o tecido, indica a maturação dessas células. Entre as variáveis biológicas que determinam a linhagem celular das células mesenquimais indiferenciadas encontram-se a tensão de oxigênio, o pH do fluido intersticial, a concentração de nutrientes, os estímulos mecânicos, a composição química da matriz extracelular e a concentração de determinados fatores reguladores.

Adriens (1999) mostrou que a partir das 48 horas após a lesão, ocorre hemólise central do coágulo sanguíneo e início da formação do tecido de granulação (migração de polimorfonucleares neutrófilos, monócitos e fibroblastos para o foco). Ao final da primeira semana já existe um tecido vascular complexo, organizado, fibroblastos e fibras colágenas. Esse tecido de granulação se mantém por aproximadamente 14 dias. As plaquetas desaparecem como fonte principal de fatores de crescimento e outros fatores, como o fator de crescimento fibroblástico e o fator de crescimento endotelial vascular promovem a angiogênese (migração e proliferação de células endoteliais e seus precursores) (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999, Molina, 2008).

Durante a segunda semana ocorre uma maior densidade de fibras colágenas (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999).

A consolidação do osso pode ocorrer de forma direta ou indireta, que consiste tanto na formação óssea intramembranosa ou endocondral. O processo de consolidação indireta é mais comum, uma vez que a direta requer redução anatômica e estabilização rígida do foco da fratura (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999, Molina, 2008).

Além dos fatores de crescimento e das citocinas pro-inflamatórias, fatores não mecânicos interferem no metabolismo ósseo, assim como os hormônios que têm papel primordial. Dos minerais, o cálcio e o fósforo possuem funções essenciais no organismo, como a formação da

estrutura óssea e dos dentes, o que torna sua demanda relativamente alta quando comparada com outros minerais. O cálcio (Ca) tem outras funções no organismo como por exemplo, no metabolismo hormonal e na coagulação sanguínea. O fósforo (P) é essencial para a formação de moléculas relacionadas com o manejo de energia e o metabolismo dentro das células (Perez 2003, Henn, 2010). O fosfato juntamente com o cálcio formam a hidroxiapatita, principal componente da matriz inorgânica do osso. A hidroxiapatita também participa das funções celulares como componentes de fosfolípidios da membrana celular, dos ácidos nucleicos, do transporte de energia e da regulação da atividade de várias enzimas (Henry, 1995). A absorção do P ocorre no intestino delgado, principalmente no duodeno. Seus níveis sanguíneos, assim como os do Ca são controlados pelo hormônio paratiróideo, vitamina D e calcitonina. A relação Ca e P da dieta parece ter influência na absorção deste mineral (Macari, 2002; Henn, 2010).

1.2. ENXERTOS

No reparo de fraturas, seja no homem ou no animal, podem se apresentar situações não encontrados no dia a dia como grandes defeitos ósseos decorrentes de trauma, perdas ósseas por remoção de tumores ou infecções, que requerem o uso de enxertos ósseos ou aloplásticos para preenchimento da falha (Castro-Varon, 2013). O enxerto aloplástico é um material utilizado para implantação nos tecidos ósseos, tais como fosfato de cálcio, hidroxiapatita, biocerâmicas, dentre outros. As características biológicas de cada um destes enxertos são variadas e podem propiciar um ou mais componentes essenciais como osteogênese, osteoindução e osteocondução. A substituição óssea pode ser feita por enxerto autólogo ou autoenxerto, enxerto alógeno ou homoenxerto, xenoenxerto ou heterólogo e por implante de material aloplástico (Garrido e Sampaio, 2010; Castro-Varon, 2013). A osteointegração, entretanto, depende em parte da quantidade e qualidade do substrato ósseo remanescente e também da capacidade de regeneração, variáveis que podem estar alteradas em diferentes condições clínicas como idade do animal ou distúrbios metabólicos que induzem a osteopenia ou osteoporose.

1.3. OSTEOPOROSE

A osteoporose é a alteração metabólica óssea mais frequente e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. É uma doença sistêmica esquelética caracterizada por densidade mineral óssea baixa e alteração na macroestrutura do osso com aumento, por conseguinte, da fragilidade óssea e da susceptibilidade a fraturas (Consensus Development Conference, 1993). A perda óssea ocorre na fase inicial da deficiência de estrogênio como consequência da reabsorção óssea aumentada. É uma alteração metabólica óssea de importância, já que modifica a capacidade de formação do osso o que representa um fator de risco para o sucesso da enxertia ou para o reparo de fraturas (Dao et al., 1993; García-Denche, 2006).

A osteoporose é avaliada clinicamente por meio da identificação de alguns metabólitos considerados como marcadores bioquímicos da remodelação óssea, que permitem analisar de forma específica a atividade metabólica óssea. Estes marcadores são proteínas resultantes da atividade osteoblástica e osteoclástica ou produtos gerados da formação ou degradação da matriz óssea (Quadro 1). Os marcadores derivados da atividade osteoblástica são de formação e podem ser determinados no soro, e os derivados da atividade osteoclástica são marcadores de reabsorção, cuja maioria é determinada na urina (Eastel e Blumsonh, 1997; Delmas, 2001; Allen, 2003; García-Denche, 2006).

	<i>Marcadores de Formação/Atividade Osteoblástica</i>	<i>Marcadores de Reabsorção/Atividade Osteoclástica</i>
<u>Soro</u>	Fosfatase alcalina total (FAT) Fosfatase alcalina óssea (FAO) Osteocalcina (OC) Propeptídeo carboxiterminal do procolágeno I (PICP) Propeptídeo aminoterminal do procolágeno I (PINP) Cálcio	Fosfatase ácida resistente al tártrato (TRAP) Telopeptídeo carboxiterminal colágeno I (ICTP)
<u>Urina</u>		Hidroxiprolina Piridinolina (PYR) Desoxipiridinolina (D-PYR) Telopeptídeo carboxiterminal do colágeno I (ICTP) Telopeptídeo aminoterminal do colágeno I (INTP)

Fonte: Monge, 2008

Quadro I. Marcadores bioquímicos de formação e reabsorção.

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por perda de massa óssea e ruptura da microarquitetura óssea e conseqüentemente aumento do risco de fraturas (Kim et al., 2011;). É sabido que o estrogênio desempenha um papel fundamental no crescimento esquelético e na homeostase óssea (Yoon et al., 2012). Isto é particularmente importante nas mulheres pós-menopausa, cujos níveis de estrogênio são naturalmente baixos. A rápida diminuição dos estrogênios nesta população é a causa predominante do desequilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção óssea (Riggs et al., 2002; Yoon et al., 2012).

Embora nenhum modelo animal específico mimetize com precisão a osteoporose, modelos animais adequados podem propiciar informações sobre a qualidade e estrutura dos ossos. Em modelos de indução de osteopenia/osteoporose a literatura relata a obtenção do quadro aproximadamente 90 dias a partir da castração (Wronski et al., 1988; Danielsen et al., 1993; Ocarino, 2004) imobilização, tenectomias, ressecção de nervos (Okumura et al., 1986; Ijiri et al., 1995; Jee e Ma, 1999). A ovariectomia é o modelo mais popular para o estudo de eventos associados com a osteoporose pós-menopausa com deficiência de estrogênio (Wronski et al.,

1988; Thompson et al., 1995; Riggs et al., 2002; Kim et al., 2011) é bem estabelecido que a ovariectomia provoca perda óssea e aumento do turnover ósseo em ratas. Assim, modelos de ratas castradas podem mimetizar as condições de mulheres pós-menopausa, o que os torna adequados para as avaliações de potenciais terapêuticas projetadas para prevenir ou tratar osteoporose humana (Miller et al., 1995, Park et al., 2010, Yoon et al., 2012).

1.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS ÓSSEOS

1.4.1. Fosfatase alcalina

A fração óssea da fosfatase alcalina (FA) é um peptídeo de 507 aminoácidos, cuja sequência é idêntica à da isoenzima hepática, diferindo apenas quanto ao grau de glicosilação. Em condições normais, as duas formas predominantes de fosfatase alcalina (>90% do total) em circulação são a forma óssea e a hepática em quantidades equivalentes (Vieira, 1999). A outra forma circulante, em concentrações significativas, é a forma intestinal que representa menos de 5% do total. A fosfatase alcalina óssea está presente na superfície externa dos osteoblastos, cujo papel ainda é pouco definido, sugerindo seu envolvimento no processo de mineralização (Gndberg, 2000; Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

A fosfatase alcalina é uma ectoenzima, ou seja, está localizada na superfície externa da célula onde exerce sua atividade. Quando ancorada na superfície celular, a enzima se apresenta na forma de um tetrâmero e adquire a forma dimérica quando liberada na circulação pela ação das fosfolipases C e D. A atividade e a importância da isoenzima óssea na formação e mineralização da matriz óssea ainda é pouco definida (Vieira, 1999). Outra fração da fosfatase alcalina pode ser expressa pelo aumento dos níveis de glicocorticoides em algumas doenças como hiperadrenocortiscismo ou associado a situações de estresse em que se produz liberação de cortisol pelas glândulas adrenais que provoca a liberação de glicose pelo fígado (Feldman, 2004). A glicose fornece energia às células musculares que o indivíduo usará para reagir em ambiente de estresse. Esta forma de fosfatase alcalina induzida por corticosteróide não foi encontrada até o momento em outras espécies (Nelson e Couto, 2001).

A fosfatase alcalina total é medida por meio de sua atividade e corresponde à soma das diversas isoformas presentes no soro. Na osteoporose, entretanto, os valores de FA total estão usualmente dentro da normalidade. Valores elevados podem ocorrer na presença de fratura ou podem sugerir a presença de doença óssea concomitante. Justamente por este método não ser tecido-específico, a existência de produção extra-óssea de FA, frequentemente hepática, não pode ser afastada. Mais de 90% do seu valor corresponde às isoformas hepática e óssea. A forma óssea, secretada pelos osteoblastos, predomina na infância até o fim do crescimento longitudinal, quando então a forma hepática passa a ser a forma circulante mais abundante. A FA é, apesar disso, ainda hoje o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado

(Bikle et al., 1997; Vieira, 1999; Watts, et al., 2001; Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002, Siqueira, 2015).

Os fenômenos ósseos associados com elevação da FA total necessitam ser de grande intensidade como nas fraturas, na doença de Paget, na displasia fibrosa, no hiperparatiroidismo com doença óssea avançada e na osteomalácia ou raquitismo. Nestas situações a FA total pode ser utilizada como um marcador de atividade da doença ou como parâmetro de resposta ao tratamento instituído. Entretanto, quando se busca maior sensibilidade e especificidade, a FA óssea é a mais indicada. Na doença de Paget, por exemplo, a FA óssea tem elevação de 60% em comparação aos níveis normais (Bikle, 1997, Garnero e Delmas, 2004 , Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

1.4.2. Osteocalcina

A osteocalcina (OC) é uma proteína da matriz óssea constituída por 49 aminoácidos, também conhecida como *Bone*, *Gla* e *BGP*. Produzida pelos osteoblastos é também encontrada na dentina. A função da osteocalcina não é clara, podendo ser o local para depósito de cristais de hidroxiapatita (Musso et al., 2015). Na formação da matriz óssea, 10 a 40% da OC sintetizada é liberada na circulação. Na osteoporose pós-menopausa encontra-se valores iguais, elevados ou reduzidos em relação aos controles normais (Eriksen, 1986; Musso et al., 2015).

A osteocalcina, que também é chamada de proteína iônica do ácido y carboxiglutâmico (Gla), é uma proteína de ligação do cálcio com a vitamina K dependente (Price et al., 1980). Esta proteína é uma das principais proteínas não colagênicas do osso e é sintetizada por osteoblastos (Lian e Friedman, 1978; Bronckers et al., 1987). O papel da osteocalcina não é completamente esclarecido, mas vários estudos sugerem que poderia atuar como um regulador da homeostase de cálcio no sangue e nos ossos. Esta osteocalcina circulante representa uma porção da proteína recém-sintetizada que não foi absorvida pelo osso, mas foi liberada diretamente na corrente sanguínea (Price et al., 1980). A presença de osteocalcina na circulação pode, portanto, fornecer um índice bioquímico específico da atividade óssea. Os níveis séricos de osteocalcina foram relatados como aumentados em pacientes com doenças ósseas metabólicas caracterizadas por aumento do turnover ósseo, como a doença de Paget e no hiperparatiroidismo (Price et al., 1980; Deftos et al., 1982).

A osteocalcina é sintetizada por osteoblastos maduros e constitui aproximadamente 15% da proteína da matriz óssea não colágena (Civitelli et al., 2009). Estudos mostraram que 80 a 90% da osteocalcina se une à hidroxiapatita óssea, impedindo sua liberação na circulação sanguínea (Lee et al., 2000).

As deficiências de cálcio e fósforo reduzem a formação de cristais de hidroxiapatita (Arifin et al., 2010) e quando a mineralização óssea diminui, a osteocalcina pode ficar livre na corrente sanguínea. Isso pode explicar o aumento das concentrações de osteocalcina no soro de mulheres na pós-menopausa com osteoporose e nas ratas ovariectomizadas (Iki et al., 2004). A deficiência

do estrogênio e a redução da formação de cristais de hidroxiapatita levam ao aumento do turnover ósseo e são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose (Chailwhith et al., 2001; Arifin et al., 2010).

A OC tem alta afinidade pelo cálcio e possui conformação helicoidal alfa compacta dependente de cálcio. Os resíduos de ácido alfa-carboxilglutâmico (Gla) de OC são capazes de se ligar à hidroxiapatita da matriz óssea, conduzindo assim à mineralização. Em condições de osteoporose pode ocorrer redução da taxa de mineralização óssea devido a redução na formação de cristal de hidroxiapatita. Nesta condição, OC livre pode estar presente na circulação, explicando, portanto o aumento da concentração sérica de OC (Garnero e Delmas, 2004; Camara et al., 2014).

1.5. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE RADIOGRÁFICA

No final da década de 1980 iniciaram-se, na odontologia, os trabalhos com o emprego da imagem radiográfica digital, com softwares que permitem análises comparativas com maior facilidade e rapidez (Ferreira e Vale, 1999). A radiologia digital introduz muitos elementos no processo diagnóstico, pois permite a melhora da imagem através da manipulação matemática, interferindo no brilho e contraste e na sua densidade. Isto proporciona melhora na percepção da visão humana e auxilia no diagnóstico (Raitz et al, 2006). Por meio desses softwares é possível determinar também os níveis de cinza de uma imagem num histograma cujos valores variam de 0 a 255. As imagens podem ser analisadas quanto ao histograma de tons de cinza determinando-se diferenças sutis de radiopacidade entre diferentes materiais (Pasquali et al., 2009; Antonietto et al., 2012).

O alcance dinâmico é o termo que define a quantidade de cinzas que um pixel poderia exibir. A intensidade de pixel, expressa como IP, é uma medida da densidade, que varia numa escala de zero (preto) a 255 (branco). No entanto, o olho humano tem pequena capacidade de distinção desta variação de tons. A obtenção de imagens com grande distinção de níveis de cinza pode ser útil como ferramenta diagnóstica. Na tentativa de se obter mais precisão, diferentes trabalhos têm sido realizados empregando-se metodologias como as propostas por Scmidt (2005) e Canali et al. (2011) dentre outros. Com o auxílio de programas de fácil acesso, como Image J de domínio público, estes autores concluíram que é possível e factível o uso do método de pixels na avaliação de densidade óssea.

2. CAPITULO II

OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA ASSOCIADA A DIETA HIPOCALCÊMICA COMO MODELO PARA INDUÇÃO RÁPIDA DE OSTEOPENIA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o modelo de indução rápida de osteopenia em ratas wistar adultas por meio da avaliação de fosfatase alcalina, osteocalcina e densidade óssea radiográfica. Foram utilizadas 18 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corporal média de 300 gramas, seis meses de idade, submetidas a ovariosalpingohistectomia (OSH) associada a dieta hipocalcêmica. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo controle alimentado com ração comercial e Grupo OSH, alimentado com ração hipocalcêmica. Avaliações radiográficas para análise de densidade óssea foram realizadas em todos os animais antes da OSH, nos dias 0, 15 e 30 de pós-cirúrgico. Nos mesmos tempos de avaliação foram colhidos 2,5 ml de sangue da veia lateral da cauda para análise de Fosfatase Alcalina e Osteocalcina no soro. Os dados obtidos de densidade radiográfica em pixels e níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina no soro foram tabulados e submetidos a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. No grupo OSH houve diferença significativa na redução da densidade aos 15 dias após a OSH, que se manteve até o terceiro tempo de avaliação e também em relação ao grupo controle. Os níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina aumentaram significativamente no grupo OSH em comparação com o controle. Sinais do início da condição osteopênica foram obtidas já aos 15 dias de início do protocolo. Os resultados permitem concluir que o modelo é satisfatório na indução precoce da osteopenia, que a mensuração da densidade óssea radiográfica em pixel é um método confiável, factível, de baixo custo, e que os marcadores bioquímicos empregados para avaliação do desequilíbrio hormonal são efetivos, mostrando relação direta com os resultados de imagem.

Palavras chaves: osteoporose, ovariectomia, osteocalcina, fosfatase alcalina.

ABSTRACT

*The objective of this study was to evaluate the model of rapid induction of osteopenia in adult wistar rats through the evaluation of alkaline phosphatase, osteocalcin and radiographic bone density. Eighteen female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with a mean body mass of 300 grams, six months old, submitted to ovarian aldosteronography (OSH) with hypocalcemic diet were used. The animals were divided in two experimental groups: Control group fed with commercial feed and OSH Group, fed with hypocalcemic feed. Radiographic evaluations for bone density analysis were performed on all animals prior to OSH on days 0, 15 and 30 post-surgery. At the same time of evaluation, 2.5 ml of lateral tail vein blood was collected for analysis of Alkaline Phosphatase and Osteocalcin in serum. The data obtained from radiographic density in pixels and levels of alkaline phosphatase and osteocalcin in the serum were tabulated and submitted to analysis of variance ANOVA and the means compared by the Tukey test with significance level of $p < 0.05$. In the OSH group there was a significant difference in density reduction at 15 days after OSH, which was maintained until the third evaluation time and also in relation to the control group. Alkaline phosphatase and osteocalcin levels were significantly increased in the OSH group compared to the control group. Signs of the onset of the osteopenic condition were obtained as early as 15 days after initiation of the protocol. The results allow to conclude that the model is satisfactory in the early induction of osteopenia, that the measurement of the radiographic bone density in pixel is a reliable, feasible, low cost method and that the biochemical markers used to evaluate the hormonal imbalance are effective, showing relationship with image results.*

Key words: *osteoporosis, ovariectomy, osteocalcin, alkaline phosphatase.*

2.1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma das alterações metabólicas ósseas mais frequente e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. É uma doença esquelética sistêmica caracterizada por densidade mineral óssea baixa e alteração na macroestrutura do osso com aumento, por conseguinte, da fragilidade óssea e da susceptibilidade a fraturas (Consensus Development Conference, 1993).

O desenvolvimento de modelos específicos de pesquisa para indução de osteoporose/osteopenia é de grande importância para a compreensão da fisiopatologia da osteoporose e o desenvolvimento de possíveis métodos de prevenção e tratamento da doença. (Sophocleous e Idris, 2014).

A diminuição da atividade física e a ausência de carga sobre o esqueleto podem contribuir para a perda óssea. A imobilização prolongada e diminuição da função muscular resultam em perda óssea rápida e grave com presença de desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. A remoção da carga física reduz a função dos osteoblastos, enquanto a estimulação mecânica tem efeito anabólico sobre a dinâmica das células, massa e qualidade ósseas (Bikle et al., 1997, Atmaca et al., 2013).

Os modelos animais propiciam material experimental mais uniforme e permitem testes prolongados com as possíveis terapias. O alto custo e o longo período de testes e avaliações são outros motivos pelos quais o modelo animal têm papel essencial na pesquisa sobre osteoporose (Hartke, 1999). Ovariectomia, mudança de dieta, medicamentos, imobilização e controle central da massa óssea são comumente utilizados nos modelos animais de osteoporose (Dequeker, 1999; Egermann et al., 2005). O modelo de ratas castradas é o mais usado na pesquisa da osteoporose pós-menopausa. Após a supressão hormonal ocorre inicialmente a reabsorção que excede a formação óssea, causando perda de osso, seguindo-se a remodelação óssea e o equilíbrio entre reabsorção e formação (Westerlind, et al., 1997; Poser et al., 2004; Lelovas et al., 2008; Atmaca et al., 2013).

A pesquisa sobre osteopenia e osteoporose é crucial em estudos de implantes ósseos em falhas e perdas de grande proporção, bem como no tratamento de fraturas em geral. Esta condição desfavorece o tratamento ortopédico e é responsável pelo insucesso ou prolongamento do tempo de recuperação. O modelo específico de castração em ratas tem possibilitado a experimentação com mínimo possível de variáveis que possam influenciar negativamente o próprio estudo (Lelovas et al., 2008; Atmaca et al., 2013).

Apesar de ser um dos modelos de pesquisa mais utilizados, ainda existem variáveis a serem esclarecidas e possíveis novas metodologias que permitam a aplicação de testes mais específicos (Westerlind, et al., 1997; Poser et al., 2004; Atmaca et al., 2013).

O objetivo deste estudo é, portanto avaliar por densitometria óssea radiográfica e pela quantificação dos marcadores bioquímicos, fosfatase alcalina e osteocalcina, a precocidade do modelo de osteopenia e a permanência desta condição durante o período experimental.

2.2. OBJETIVOS

Avaliar o protocolo OSH associado a dieta hipocalcêmica como modelo de indução osteopênica precoce em ratas wistar.

Avaliar a metodologia de análise da densidade óssea radiográfica como método de identificação da condição osteopênica em ratas wistar submetidas a OSH associada a dieta hipocalcêmica.

Analisar o comportamento dos marcadores bioquímicos fosfatase alcalina e osteocalcina em ratas com osteopenia induzida.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura do Centro experimental de Pequenos Animais do Hospital Veterinário, o Laboratório de Patologia Clínica e o Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Setor de Diagnóstico por Imagem da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme protocolo N° 277/2016, em anexo.

2.3.1. Protocolo para indução da osteopenia

Foram utilizadas 18 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas jovens com massa corporal média de 300 gramas e seis meses de idade, alojadas em caixas plásticas de 41 x 34 x 16cm (três ratas/caixa), recebendo ração comercial (12 g/kg de cálcio, 8,5g /kg de fósforo e 230 g/kg de proteína- PRESENCE alimentos, Barão Geraldo- SP, Brasil), (Grupo controle) ou dieta deficiente em cálcio (0,6 g /kg de cálcio, 0,32 g/kg de fósforo e 143 g/kg de proteína- RHOSTER, Araçoiaba da Serra-SP, Brasil) (Grupo OSH). Os animais receberam água ad libitum e foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a uma temperatura de 25 °C.

Os 18 animais foram divididos em dois grupos: grupo A- ratas submetidas à ovariectomia (OSH) e alimentadas com ração hipocalcêmica até o final do estudo e grupo B- ratas sem OSH e dieta comercial, constituindo o grupo controle.

Para a OSH os animais foram anestesiados por meio de anestesia inalatória com isoflurano. Uma incisão de aproximadamente 1 cm de comprimento foi realizada na região abdominal ventral e os ovários e cornos uterinos expostos e removidos, foram feitas as ligaduras e a sutura do plano muscular com caproyl n° 5 e sutura de pele com nylon n° 6. Meloxicam (0,2mg/kg) foi administrado cada 24 horas por 3 dias.

2.3.2. Análise Bioquímica

Para a coleta de sangue os animais foram inicialmente contidos em uma câmara de indução anestésica, evitando-se ao máximo o estresse. Foi utilizada anestesia inalatória com isoflurano na concentração de 1-3% segundo a necessidade. Após a obtenção do plano anestésico a rata foi retirada da câmara de indução, posicionada em decúbito lateral (Fig. 1-B) e a anestesia foi mantida por meio de máscara (Fig.1- A). Com auxílio de cateter 24 foram coletados da veia lateral da cauda, 2,5 ml de sangue em tubos sem anticoagulante para determinação da fosfatase alcalina sérica e osteocalcina (Fig.1- C, D). Avaliações radiográficas foram realizadas para determinação basal da massa óssea no pré-cirúrgico. Em seguida as ratas do grupo A foram submetidas a ovariectomia sob anestesia inalatória com isoflurano. Avaliações radiográficas e análise da fosfatase alcalina e osteocalcina sérica foram realizadas nos dias 0, 15 e 30 após a OSH.



Figura 1. Coleta de sangue. A) Anestesia com emprego de máscara. B) Posição em decúbito lateral para coleta de sangue. C) Localização anatômica da veia caudal da rata. D) Coleta da sangue da veia caudal da rata com emprego de cateter endovenoso 24 G.

A amostra de sangue foi centrifugada a 3500 rpm durante seis minutos para obtenção do soro que foi armazenado no freezer a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após um mês as amostras foram descongeladas ao banho maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos e utilizados 250 μl para análise de osteocalcina e 150 μl para análise em duplicata de fosfatase alcalina.

Para detecção dos níveis de fosfatase alcalina empregou-se o kit laboratorial (Labtest) em Analisador Bioquímico automático (Cobas Mira Roche). A atividade enzimática foi expressa em U/L. Para análise de imunofluorescência empregou-se kit comercial para osteocalcina IMMULITE® 2000/IMMULITE® (SIEMENS).

2.3.3. Avaliação Radiográfica e de densidade óssea

Foram realizadas duas projeções radiográficas: médio-lateral e crânio-caudal das tíbias direita e esquerda do grupo controle aos 0, 15 e 30 dias do início do estudo e, no grupo OSH foram realizadas as mesmas avaliações antes da realização da OSH, constituindo o dia 0, aos 15 e 30 dias pós-cirúrgico. Em todas as radiografias utilizou-se 55 kv e mAs 0,006 no aparelho de Raios x digital REGIUS modelo 110 de 500 mA da Escola Veterinária da UFMG. Para padronização da técnica radiográfica foram realizadas várias imagens com diferentes dosagens até se obter aquela desejada.

Foi realizada a avaliação da intensidade de pixel que é uma medida da densidade numa escala de zero (preto) a 255 (branco). As imagens digitais obtidas foram arquivadas em formato TIFF a 8 bits numa matriz de pixels de 2010 x 2447 e tamanho de 4.7 MB.

As imagens foram processadas no software Image J, de domínio público, e foi criada uma área de mensuração de 800 pixels no formato de retângulo (Fig. 2), correspondendo à área de interesse, para assim determinar os níveis de cinza médios em cada região. A área selecionada

correspondeu ao terço proximal das tíbias direita e esquerda de todos os animais, avaliada nos três tempos especificados. As áreas foram selecionadas individualmente e a cada mensuração a ferramenta *Histogram* (Fig. 2) era selecionada para obter a média de densidade de cada área de interesse. Esta metodologia aqui empregada já foi avaliada e corroborada por avaliações conjuntas de raios x e densitometria óssea (Schmidt, 2005; Pasquali, 2012; Antonietto, 2012).

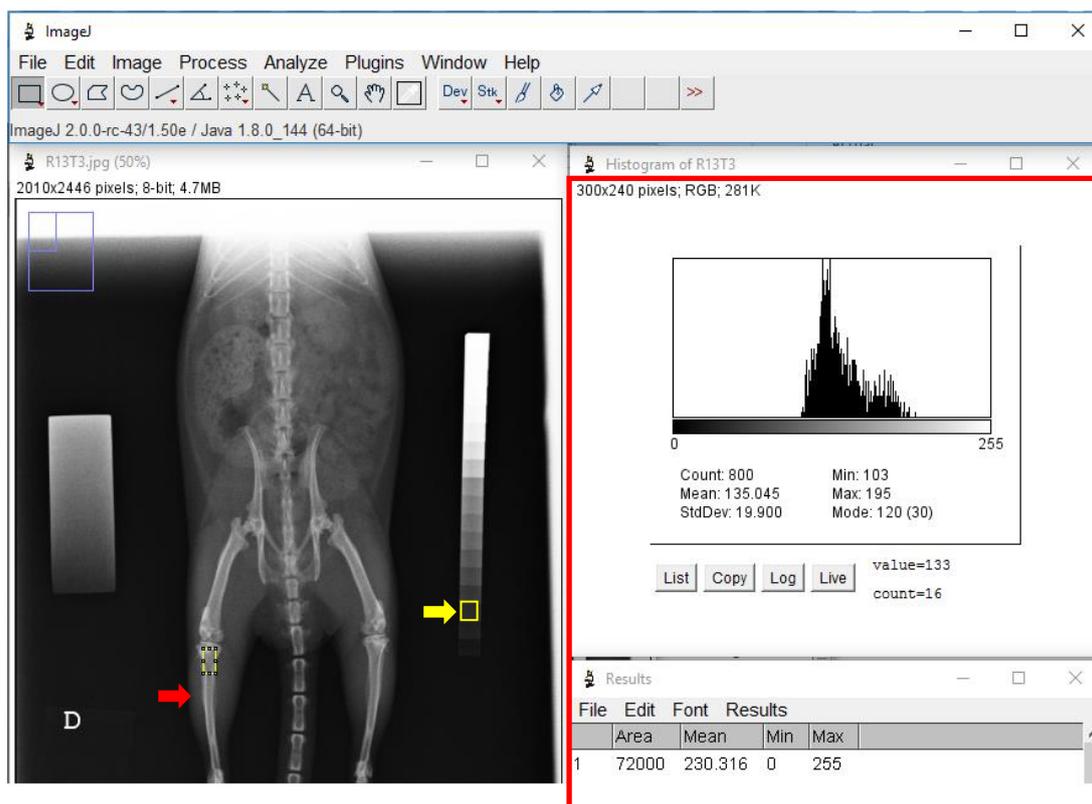


Figura 2. Ilustração da avaliação da densidade radiográfica com auxílio do programa Image J. Determinação da área de interesse (seta vermelha). Histograma com valores de avaliação: tamanho da área, média, valor máximo, valor mínimo e desvio padrão da área de interesse (quadro vermelho). Determinação da área de referência ou controle na escala de alumínio (seta amarela).

Após a análise da densidade mineral óssea das radiografias, os dados referentes às médias dos valores em pixels, numa escala de 8 bits, foram tabulados e foi feito um estudo comparativo dos graus de densidade encontrados nas radiografias.

Foi selecionada uma segunda área sobre uma escala de alumínio (liga 6063 ABNT, de 18 degraus) determinando uma área de 600 pixels sobre o quinto degrau da escala (Fig. 2- seta amarela) em todas as radiografias, as medias foram tabuladas e feita comparação pelo teste de tukey, constituindo a região controle.

2.3.4. Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso. Para cada variável, a média e o desvio padrão foram determinados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

2.4. RESULTADOS

O manuseio das ratas ocorreu sem dificuldades em ambiente tranquilo com manipulação adequada, firme, mas gentil. Os animais foram se adaptando ao longo do experimento, aos procedimentos de coleta das amostras e administração de medicamentos. Esta prática de manejo permitiu que fossem feitas avaliações e coleta de amostras periódicas no mesmo animal sem transtornos.

A utilização do isoflurano como agente anestésico mostrou-se ideal para contenção dos animais, além da facilidade de indução e recuperação anestésica rápida tanto nos procedimentos de coleta e avaliações radiográficas quanto para os procedimentos cirúrgicos.

A coleta dos 2,5 ml de sangue em intervalos de 15 dias não mostrou qualquer efeito adverso.

2.4.1. Análise Bioquímica

Não se verificou diferença significativa na concentração de osteocalcina no soro dos animais do grupo controle nos tempos avaliados (Fig. 3).

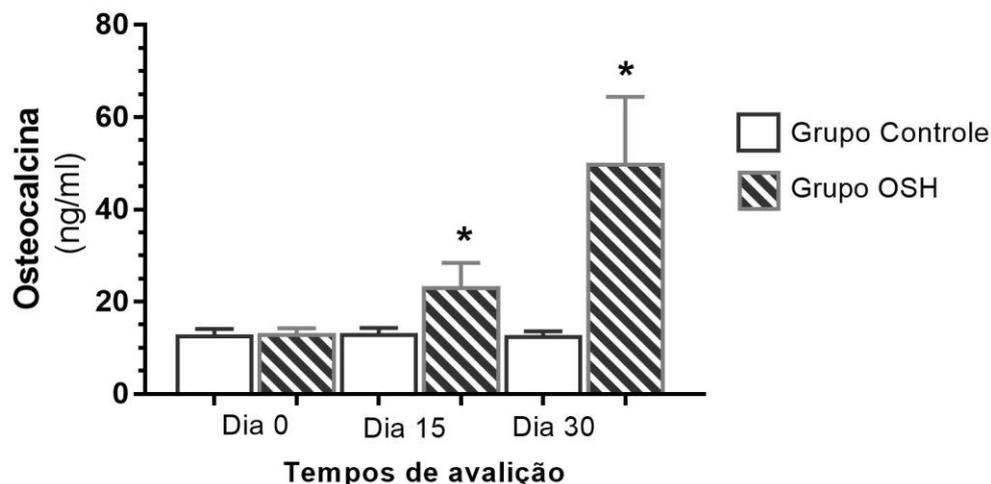


Figura 3. Níveis de osteocalcina total no soro dos diferentes grupos experimentais em ratos wistar, nos três tempos de avaliação. Observa-se aumento significativo da osteocalcina sérica no grupo OSH quando comparado ao controle. (*estatisticamente significante, $p < 0,05$).

Em contrapartida, nos animais do grupo OSH, aos 15 dias já se evidenciou diferença estatística significativa em relação ao dia 0 e ao grupo controle. Esta diferença foi ainda mais acentuada aos 30 dias (Fig. 3), mostrando elevação na concentração de osteocalcina de aproximadamente quatro vezes em relação ao grupo controle e à avaliação no dia 0 e de cerca de duas vezes em relação ao dia 15 (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos níveis de OC no soro (ng/ml) em ratos wistar castradas e não castradas nos três tempos de avaliação

Variável	Grupos					
	Controle Dia 0	Controle Dia 15	Controle Dia 30	Grupo OSH Dia 0	Grupo OSH Dia 15	Grupo OSH Dia 30
Osteocalcina (ng/ml)	12,95±1,13 a	13,23±1,08 a	12,72±0,86 a	13,16±1,08 a	23,32±5,11 b	50,12±14,32 c

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$)

Nos valores referentes à mensuração de fosfatase alcalina, tanto no grupo controle como no grupo OSH não houve diferença significativa entre o primeiro e o segundo tempo (Fig. 4). No grupo OSH observou-se se aumento significativo no último tempo de avaliação, enquanto o controle se manteve na faixa de 580 U/L, semelhante ao dia 15.

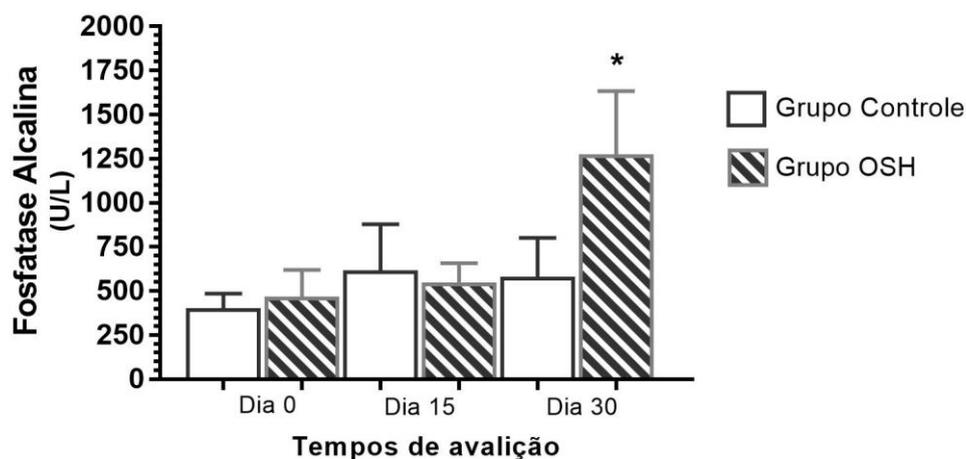


Figura 4. . Avaliação da fosfatase alcalina total (FA) no soro de ratas submetidas ou não a OSH. Observa-se aumento significativo da FA sérica no grupo OSH aos 30 dias (*estatisticamente significativa, $p < 0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos níveis de FA no soro (U/L) em ratas wistar castradas e não castradas nos três tempos de avaliação.

	Tempo de Avaliação		
	Dia 0	Dia 15	Dia 30
Grupo controle	401,64±83,28 Ca	618,74±259,86 Ca	582,47±219,27 Ba
Grupo OSH	468,26± 151,38 Cb	548,10± 110,24 Cb	1275,69± 358,81 Aa

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúscula na linha ($p > 0,05$).

2.4.2. Avaliação radiográfica e de densidade óssea

Após determinar a área de referência sobre a escala de alumínio, as médias no histograma foram tabuladas e comparadas pelo teste de Tukey, não ocorrendo diferença significativa, o que tornou desnecessária a utilização de fator de correção para comparação dos dados (Fig. 5). A média de valores dos pixels das regiões de controle foram semelhantes entre si, dentro de cada grupo.

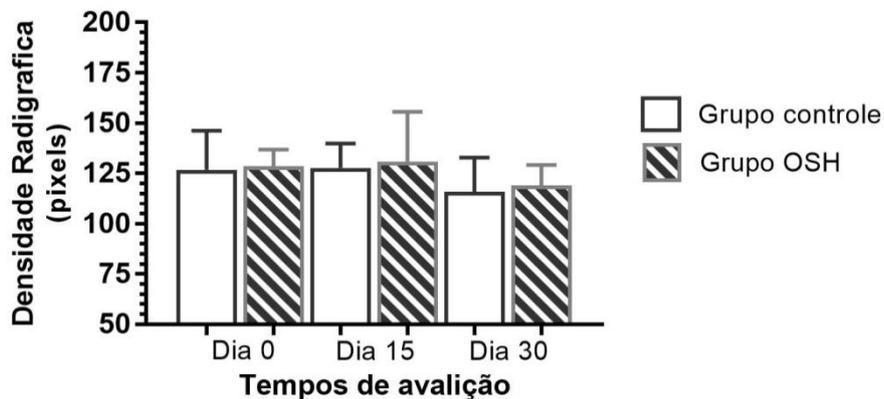


Figura 5. Densidade radiográfica em pixels, da área de controle dos raios x de todos os animais. Observa-se que não houve diferença significativa na média de pixels entre os grupos comparados.

No grupo OSH a análise das médias dos grupos mostrou redução dos valores de pixels nas ratas submetidas a OSH (Fig. 6) com diferença significativa em relação ao dia zero, indicando perda óssea. Entre os dias 15 e 30 houve queda lenta e gradativa, porém não significativa.

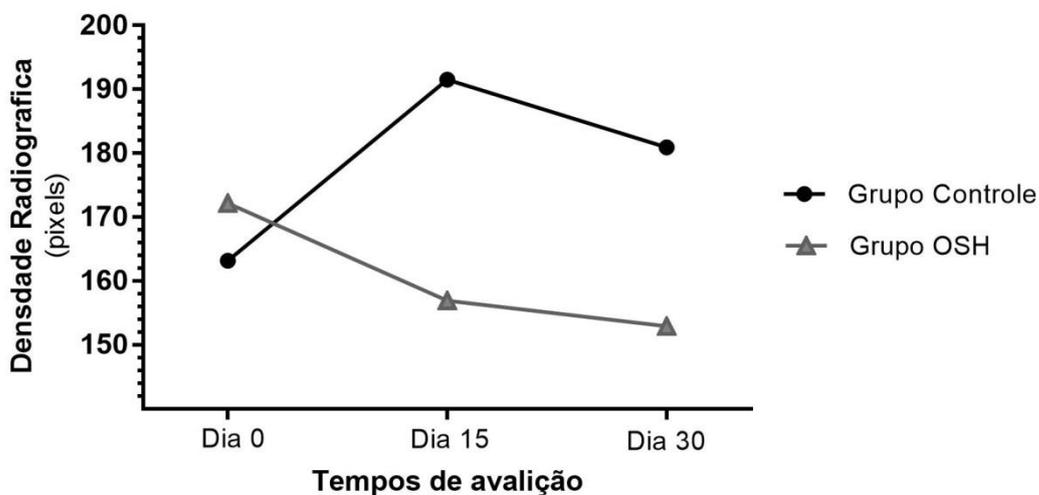


Figura 6. Densidade radiográfica em pixels nos três tempos de avaliação: zero, 15 e 30 dias pós-cirúrgico, grupo OSH e grupo controle. Observa-se no grupo OSH diminuição significativa da média de pixels quando comparado com o controle.

Contrariamente ao grupo OSH, ocorreu aumento do valor de pixels no grupo controle entre o dia zero e o dia 15 (Fig. 6), mostrando diferença significativa. A partir do dia 15 observou-se queda gradual dos valores mantendo-se ainda superiores aos do dia 0, permanecendo no intervalo 181.56 ± 12.77 . Ao comparar-se os tempos entre os grupos observa-se diferença significativa entre os grupos controle e OSH a partir do dia 15 de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Densidade radiográfica (pixels) em ratas castradas e não castradas nos três tempos de avaliação

	Tempo de Avaliação		
	Dia 0	Dia 15	Dia 30
Grupo controle	163,18± 15,81 Ca	191,47± 5,19 Ab	181,56± 12,77 Ab
Grupo OSH	173,63± 8, 57 Ca	154,7± 8,91 Bb	151,18± 12,75 Bb

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúscula na linha. Anova e pós-teste Tukey, média e desvio padrão ($p > 0,05$).

2.5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de diferentes protocolos para o estudo da osteoporose é constantemente aprimorado e testado, com vistas ao emprego de técnicas de avaliação mais avançadas que auxiliem no entendimento dos mecanismos de funcionamento e/ou desequilíbrio da homeostase óssea, ainda não totalmente compreendidos.

A rata é um modelo animal ideal para este estudo pois, além de fácil manuseio, seu metabolismo mais acelerado favorece avaliações clínicas e laboratoriais periódicas e completas em menor tempo de estudo. No entanto, é imprescindível a adaptação à manipulação humana, a adequada contenção para coleta de amostras e administração de medicamentos sem estresse ou com o mínimo possível (Dequeker, 1999; Egermann et al., 2005). É interessante salientar ainda que as amostras foram obtidas do mesmo animal na sequência prevista até o final do estudo, pois em geral utiliza-se um animal para cada coleta. Portanto, a metodologia empregada possibilitou a diminuição do número de animais no estudo, bem como a eliminação do fator diferença individual.

A castração, a mudança de dieta, drogas, imobilização e reprodução são comumente usados para se estabelecer um modelo animal de osteopenia/osteoporose e verifica-se que após a ovariectomia, a reabsorção óssea excede a formação inicialmente, causando acentuada perda óssea (Egermann et al., 2005; Atmaca et al., 2013), mas logo após ocorre o equilíbrio entre as duas fases. A castração, seja ovariectomia ou ovariohisterectomia, é um modelo que oferece vantagens sobre os demais, pois permite avaliar de forma exclusiva o efeito da suspensão hormonal. A associação de OSH com dieta hipocalcêmica usada neste estudo, promove resultados precoces e favorece a manutenção da condição osteopênica pelo período necessário.

O modelo possibilita a indução de um estado de desequilíbrio ósseo natural sem interferência de fármacos, como no caso da osteoporose induzida por corticóides e sem a necessidade de imobilização prolongada que pode ocasionar variações decorrentes de estresse, além de outras (Dequeker, 1999; Egermann et al., 2005)

A densidade radiográfica óssea significativamente diminuída no grupo OSH (Tabela 3 / Fig. 5) foi também relatada por Kalaiselvi et al. (2013) e Camara, (2014). Neste estudo, o efeito da suspensão hormonal é evidente e significativa já aos 15 dias, com redução da queda aos 15 dias subsequentes, sugerindo, como já relatado por Atmaca (2013) o controle da perda óssea pelo

próprio organismo, apesar da manutenção da dieta hipocalcêmica. A recuperação orgânica entretanto, não é suficiente para reverter o quadro osteopênico, mantendo ainda a diferença significativa entre 15 e 30 dias. No grupo controle a situação é inversa ao grupo OSH e dieta hipocalcêmica. A elevação acentuada e significativa no grupo controle mostra a ação do organismo, neste caso, pela reabsorção do excesso e retorno aos valores basais.

A deficiência de estrogênio induz ao desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea que reduz a massa esquelética (Ocarino, 2008; Kalaiselvi et al., 2013; Camara et al., 2014) e é um fator importante no desenvolvimento de osteopenia/osteoporose, situação considerada crítica em pacientes com traumas ósseos.

O aumento da FA é geralmente associado a graves desequilíbrios ósseos e a literatura reporta elevações significativas na presença de fenômenos de grande intensidade (Bikle, 1997, Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002, Garnero e Delmas, 2004,). Neste estudo o aumento do turnover ósseo desencadeado pela supressão hormonal associada com a dieta hipocalcêmica, promove elevação dos níveis de fosfatase alcalina em proporção significativa quando comparado com os animais não submetidos a OSH e dieta hipocalcêmica.

Apesar de ser uma variável frequentemente estudada (Bikle, 1997; Vieira, 1999; Siqueira, 2015), a fosfatase alcalina mesmo sendo uma proteína localizada na superfície de células osteoblásticas, é um marcador não específico que deve ser estudado mais detalhadamente.

A fosfatase alcalina total é mensurada através de sua atividade e corresponde à soma das diversas isoformas presentes no soro. Tem sido relatado que os valores de FA na osteoporose encontram-se usualmente, dentro da normalidade. Contudo, o aumento significativo dos níveis de FA, duas vezes mais no grupo OSH, sugere que ela pode ser considerada marcador efetivo neste estudo. Essa FA, entretanto pode não ser somente do tecido ósseo, já que existe uma produção extra óssea (frequentemente hepática) (Watts et al., 2001) ou córtico induzida em casos de estresse (Feldman, 2004). Isso, entretanto não justifica sua retirada das análises dos estudos de mecanismos de funcionamento ósseo. A FA córtico induzida pode ser minimizada por controle do estresse como realizado neste estudo, considerando a adaptação pré-experimental dos animais associada ao manejo delicado, cuidadoso e ao uso da câmara de indução anestésica nos diferentes procedimentos estabelecidos na metodologia. A contenção química com isoflurano e anestesia sem excitação com auxílio da câmara de indução, previne a alteração da FA induzida pelo aumento do metabolismo hepático, que pode ser alterado quando se emprega fármacos que são metabolizados pelo fígado, como a cetamina.

No estudo de Siqueira (2015) foi relatado aumento significativo da concentração da FA no soro de camundongos do grupo controle em relação aos grupos de animais submetidos à OSH, contrário portanto, aos achados deste estudo e da maioria da literatura. O autor não encontrou justificativa para os achados.

O fósforo e o cálcio disponíveis no organismo são alguns dos fatores que regulam o metabolismo ósseo (Colin et al., 1999; Garnero e Delmas, 2004; Camara et al., 2014). Na

osteoporose a absorção intestinal desses elementos se torna comprometida, interferindo, portanto na homeostase óssea. Neste estudo o modelo de supressão hormonal associado com baixa oferta destes minerais na dieta, favorece um estado osteopênico avançado já aos 15 dias de estudo e a manutenção da condição osteopênica aos 30 dias, garantindo um tempo menor do estudo. Constitui-se portanto, em um modelo eficaz para indução de osteopenia precoce e sua manutenção.

A osteocalcina sintetizada pelas células osteoblásticas (Chailwhith et al., 2001; Camara et al., 2014) é um marcador com alta afinidade pelo cálcio, que se liga à HA e carrega o cálcio, promovendo sua absorção pela matriz óssea, processo denominado mineralização (Camara et al., 2014). No modelo de OSH associado com dieta hipocalcêmica induz-se diminuição na formação de cristais de HA pela baixa concentração de cálcio e fósforo circulante. Isso explicaria o aumento da osteocalcina já que esta se encontra livre na corrente sanguínea como resultado da não ligação ao cálcio ou especificamente à HA, com redução do processo de mineralização óssea nos animais do grupo OSH (Tab. 1 /Fig.3). Iki et al (2004) e Camara et al. (2014) relatam elevadas concentrações de osteocalcina no soro de mulheres pós-menopausa com osteoporose e nas ratas submetidas a OVH/OSH. A ausência de diferença significativa entre os grupos controle nos três tempos propicia um valor de referência dos níveis basais de osteocalcina neste estudo.

O modelo executado nesse estudo mostra o início da instalação do quadro osteopênico precoce aos 15 dias, evidenciado nos níveis de osteocalcina e na avaliação da densidade radiográfica, garantindo assim o estado do quadro osteopênico aos 30 dias, fator favorável às pesquisas nesta linha. Isto leva a uma diminuição do tempo dos protocolos de indução que reportam obtenção do quadro osteopênico aos 90 dias (Wronski et al., 1988; Danielsen et al., 1993; Westerlind et al., 1997; Ocarino, 2004), pelo emprego de técnicas de castração ou imobilização, tenectomias, ressecção de nervos (Okumura et al., 1986; Ijiri et al., 1995; Jee e Ma, 1999).

2.6. CONCLUSÕES

Nas condições desse estudo pode-se concluir que:

A associação da OSH com dieta hipocalcêmica constitui-se em um modelo eficaz para indução de osteopenia precoce.

Os marcadores bioquímicos, fosfatase alcalina e osteocalcina estão diretamente relacionados com a apresentação da doença óssea e com o quadro imaginológico.

A osteocalcina assim como a densidade óssea radiográfica são marcadores de identificação precoce da doença óssea com manifestação evidente já aos 15 dias após iniciado o processo de indução osteopênica

A fosfatase alcalina tem elevação significativa nos seus níveis séricos quando já instalado o estado osteopênico aos 30 dias.

.

3. CAPITULO III

BIOCERÂMICA DE HIDROXIAPATITA E TRIFOSFATOS DE CÁLCIO DE ABSORÇÃO RÁPIDA E LENTA NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO EM RATAS COM OU SEM OSTEOPENIA INDUZIDA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da biocerâmica β HA/TCP na reparação óssea de ratas com ou sem osteopenia induzida. Foram utilizadas 36 ratas albinas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com massa corporal média de 300 gramas e seis meses de idade. As ratas foram divididas em dois grupos: animais submetidos a OSH e dieta hipocalcêmica (Grupo OSH) e de animais não castrados com dieta comercial (Grupo Controle). Após a confirmação da indução osteopênica por meio de densidade radiográfica óssea do grupo A, foi criado um defeito no terço proximal de tíbia direita e esquerda de todos os animais e implantada a biocerâmica: grupo I (GI) animais submetidos a OSH que receberam a biocerâmica β HA/TCP de absorção rápida; grupo II (GII) animais submetidos a OSH e com implantação da biocerâmica β HA/TCP de absorção lenta e grupo III (GIII), constituído por animais submetidos a OSH nos quais o defeito permaneceu vazio (grupo controle negativo); os grupos IV (GIV), V (GV) e VI (GVI) foram constituídos por fêmeas não submetidas a OSH. No GIV foi implantada a biocerâmica β HA/TCP de absorção rápida, no GV a β HA/TCP de absorção lenta e o GVI constituiu o grupo controle negativo. Foram feitas avaliações radiográficas nos dias 0, 15 e 30 pós-implante e avaliações histológicas aos 15 e 30 dias. Foi observada a formação de redes vasculares, tecido osteóide e matriz óssea em todos os grupos tratados com β HA/TCP de absorções rápida e lenta e nos grupos controles negativos foi observada a formação de uma cortical fina e descontínua a partir do osso preexistente. Nos grupos controle com β HA-TCP de absorções lenta e rápida verificou-se o mesmo tipo de neoformação do grupo com osteopenia, porém com um processo de regeneração mais avançado. A β HA/TCP de absorção rápida e lenta é um biomaterial favorável no tratamento de falhas ósseas, que favorece a regeneração. A β HA/TCP de absorção rápida mostrou-se um material promissor, diferenciado, com a neoformação de um tecido mais organizado, no reparo de falhas ósseas em condições osteopênicas.

Palavras chaves: osteopenia, densidade radiográfica, ovariectomia.

ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the effect of β / HA bioceramics on bone repair of rats with or without induced osteopenia. Thirty - six Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with a mean body mass of 300 grams and six months of age were used. The rats were divided into two groups: animals submitted to OSH and hypocalcemic diet (OSH Group) and uncastrated animals with commercial diet (Control Group). After confirming the osteopenic induction by means of bone radiographic density of group A, a defect was created in the proximal third of right and left tibia of all the animals and the bioceramic was implanted: group I (GI) animals submitted to OSH that received the bioceramic β HA / TCP fast absorption; group II (GII) animals submitted to OSH and with implantation of bioceramic β -HA / TCP of slow absorption and group III (GIII), consisting of animals submitted to OSH in which the defect remained empty (negative control group); the groups IV (GIV), V (GV) and VI (GVI) were composed of females not submitted to OSH. In the GIV, the fast-absorption bioceramic β -HA / TCP was implanted in the GV to β -HA / TCP of slow absorption and the GVI constituted the negative control group. Radiographic evaluations were performed at days 0, 15 and 30 post-implant and histological evaluations at 15 and 30 days. The formation of vascular networks, osteoid tissue and bone matrix was observed in all groups treated with fast and slow absorption of β -HA / TCP and in the negative control groups the formation of a thin, discontinuous cortical was observed from the preexisting bone. In the control groups with β HA-TCP of slow and rapid absorptions the same type of neoformation of the group with osteopenia was verified, but with a more advanced regeneration process. The rapid and slow absorption of β / HA is a favorable biomaterial in the treatment of bone defects, favoring regeneration. Rapid absorption of β -HA / TCP proved to be a promising material, differentiated with the formation of a more organized tissue, in the repair of bone defects under osteopenic conditions.*

Key words: osteopenia, radiographic density, ovariectomy.

3.1. INTRODUÇÃO

O uso de implantes osteointegráveis constitui uma alternativa promissora no tratamento de grandes defeitos ósseos decorrentes de trauma, perdas ósseas por remoção de tumores ou infecções que necessitem preenchimento da falha (Castro-Varon, 2013). Entretanto, apesar da evolução das técnicas cirúrgicas, da modificação de superfícies de implantes e dos avanços no campo dos biomateriais, ainda continua busca de tratamentos adequados em alguns pacientes com alterações metabólicas que interferem no processo de regeneração tecidual (Finni et al., 2004).

A osteointegração depende em parte da quantidade e qualidade do tecido ósseo e da capacidade de regeneração que podem ser influenciadas pela idade do paciente ou por distúrbios metabólicos como a osteopenia (Consensus Development Conference, 1993).

A osteoporose é a alteração metabólica óssea mais frequente e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. É uma doença sistêmica esquelética caracterizada por uma densidade mineral óssea baixa e alteração na macroestrutura do osso com o aumento, por conseguinte, da fragilidade óssea e da susceptibilidade a fraturas (Consensus Development Conference, 1993). Estima-se que em 2002, aproximadamente 30 milhões de mulheres mostravam osteoporose ou osteopenia com uma projeção de aumento de 41 milhões em 2020 (Kelley e Kelley., 2004; Ocarino, 2004).

Considerando que o osso é um tecido dinâmico ou seja, está em constante deposição e reabsorção, sujeito à influencia da idade, saúde geral, alterações hormonais, tem se desenvolvido biomateriais com diferentes propriedades físicas e químicas direcionadas para cada situação clínica do paciente. Nesta categoria encontra-se a biocerâmica de fosfato de cálcio nano estruturada micro macro porosa em grânulos de absorção lenta e rápida, cujas diferentes taxas de absorção, permitem prolongar sua permanência no organismo, pelo tempo necessário para reparação óssea. A maior proporção de fosfatos de cálcio na biocerâmica de absorção rápida (80% Trifosfatos de cálcio e 20 % de Hidroxiapatita) faz com que sua reabsorção no organismo seja significativa nos primeiros oito dias da implantação, situação apropriada para pacientes saudáveis e em situações clínicas desfavoráveis. As variações na percentagem da HA e de fosfatos de cálcio são a chave para controlar o tempo de permanência do material no local implantado, conferindo ao implante uma taxa de absorção gradativa (Aristizabal, 2013; Castro-Varon, 2013). As variações na proporção dos componentes das biocerâmicas tornam possível a utilização de implantes com características específicas para cada estado clínico do paciente. A biocerâmica fosfocálcica bifásica micro-macro porosa β HA/TCP em grânulos de absorção rápida e lenta (Osteosynt) é um produto com características e propriedades físico-químicas semelhantes à matriz mineral do tecido ósseo, possui micro poros de 10 μ m de diâmetro e macro poros de até 400 μ m. É um material biocompatível e não apresenta nenhum sinal de reações adversas, favorece a formação de uma rede vascular entre os poros da biocerâmica a partir da primeira semana de implantação (Pataro, 2005; Lobo et al., 2009; Lobo e Arinze, 2010; Aristizabal, 2013; Castro-Varon, 2013). A presença destes poros permite a deposição das

células e a condução do processo por haptotaxia favorecendo a formação de matriz óssea entreando o biomaterial implantado no defeito crítico. A formação óssea ocorre dentro dos poros e na superfície do material, resultando em aderência devido à liberação de substância cimentante amorfa produzida pelo osteoblasto para dar estrutura e resistência mecânica ao sistema (PATARO, 2005; ARISTIZABAL, 2013; CASTRO-VARON, 2013).

É importante ressaltar que as respostas orgânicas diferem de acordo com o material utilizado, o que significa que diferentes cerâmicas podem provocar respostas orgânicas diferenciadas. Essas respostas estão diretamente relacionadas com a estrutura tanto físico-química quanto arquitetônica do material usado para reconstrução óssea. A estrutura físico-química do biomaterial é o ponto chave na reparação óssea. A β HA/TCP de absorção lenta ou rápida, formada de fosfatos de cálcio, com porosidade adequada, apresenta uma granulometria variada e não tem alteração das características físico-químicas quando no organismo até que ocorra a neoformação óssea desejável e necessária, atuando, portanto como arcabouço para a multiplicação celular (GARRIDO et al., 2011; CASTRO-VARON, 2013).

Em estudos anteriores (ARISTIZABAL, 2013; CASTRO-VARON, 2013) verificou-se que o composto de β HA/TCP de absorção rápida ou lenta é um biomaterial promissor na reconstrução óssea com vantagem clínico-cirúrgica, uma vez que pode ser usado em diferentes áreas da medicina, da odontologia e da medicina veterinária, mostrando-se como alternativa viável para emprego em traumatologia em geral.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da β HA/TCP de absorções rápida e lenta por meio de avaliação histológica e da densidade radiográfica, em ratas com e sem osteopenia experimental.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 36 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corporal média de 300 gramas, seis meses de idade, clinicamente saudáveis, alojadas em caixas plásticas de 41x34x16cm (três ratas/caixa), mantidas no Centro experimental de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas receberam ração comercial (12g/kg de cálcio, 8,5g/kg de fósforo e 230g/kg de proteína- PRESENCE alimentos, Barão Geraldo- SP, Brasil) (Grupo controle) ou dieta deficiente em cálcio (0,6g/kg de cálcio, 0,32g/kg de fósforo e 143g/kg de proteína- RHOSTER, Araçoiaba da Serra-SP, Brasil) (Grupo OSH) água *ad libitum* e foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro à temperatura de 25°C. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme protocolo N° 277/2016 (anexo I). O estudo foi dividido em duas fases: indução osteopênica e implantação do biomaterial de absorção rápida e lenta.

3.2.1. Primeira Fase: Osteopenia experimental

Os 36 animais foram divididos em dois grupos: grupo A- ratas submetidas a ovarioalpingohisterectomia (OSH); subdivididas em grupos com implantação da β HA/TCP de absorção lenta, β HA/TCP de absorção rápida e controle negativo; o grupo B- ratas sem OSH divididos nos mesmos subgrupos.

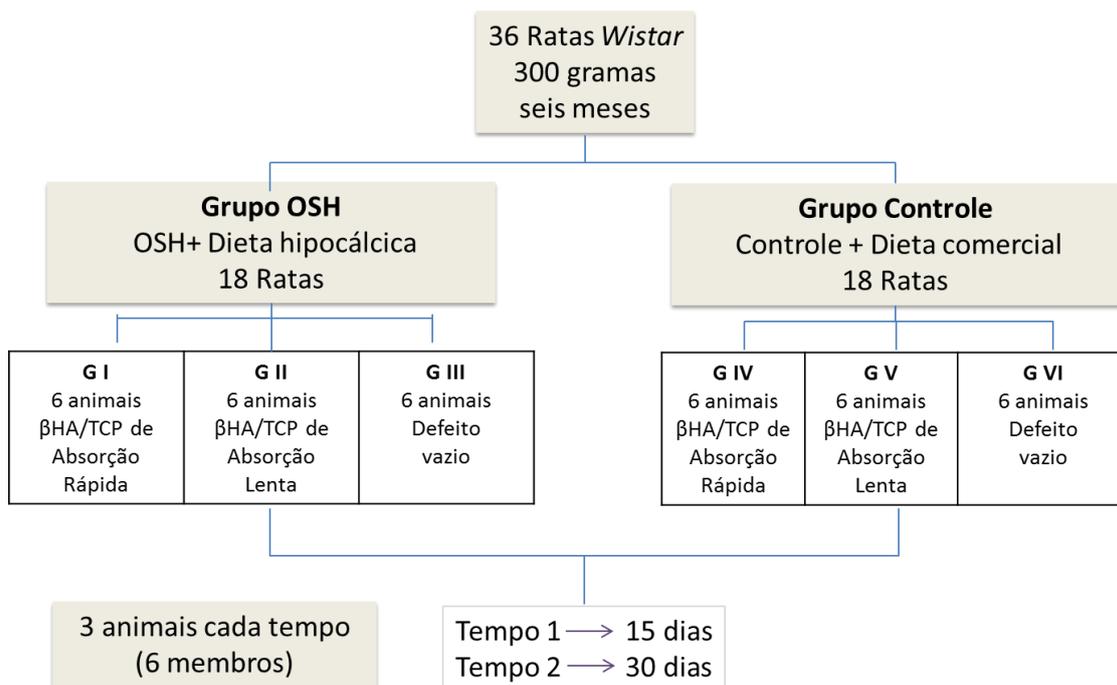


Figura 7. Diagrama do desenho experimental.

Foram feitas avaliações radiográficas para determinação basal da massa óssea no momento pré-cirúrgico, seguindo-se a ovarioalpingohisterectomia mediante anestesia inalatória, no grupo A. Avaliações radiográficas subsequentes foram realizadas aos dias 15 e 30 após ovarioalpingohisterectomia (OSH) até a confirmação de osteopenia.

3.2.2. Segunda fase: Implantação da biocerâmica em grânulos

Aos 30 dias após a OSH e confirmação da condição osteopênica nos animais do grupo A, as 36 ratas foram submetidas a cirurgia para criação de um defeito ósseo de 4 x 3 mm no terço proximal da tíbia seguido pela implantação da biocerâmica lenta ou rápida, segundo os grupos já mencionados.

Para a implantação cirúrgica foi feita tricotomia ampla dos membros posteriores direito e esquerdo desde a região proximal do fêmur até a região metatársica. O animal foi posicionado em decúbito dorsal com os membros pélvicos estendidos e foi realizada antissepsia com solução de clorexidina degermante seguida por solução de clorexidina alcoólica. A abordagem cirúrgica foi realizada segundo preconizado por Piermattei & Johnson (2004). Foi realizado o defeito de 4 x 3 mm no terço proximal das tíbias direita e esquerda com o emprego de broca e furadeira pneumática (Fig. 8). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais de seis animais cada, distribuídos em: grupo I (GI) animais submetidos a OSH que receberam a biocerâmica β HA/TCP de absorção rápida em grânulos de 40-60 *mesh* nos membros pélvicos direito e esquerdo; grupo II (GII) animais submetidos a OSH e com implantação da biocerâmica β HA/TCP de absorção lenta em grânulos de 40-60 *mesh* nos membros pélvicos direito e esquerdo e grupo III (GIII), constituído por animais submetidos a OSH nos quais o defeito permaneceu vazio (grupo controle negativo). Os grupos IV (GIV), V (GV) e VI (GVI) foram constituídos por fêmeas não submetidas a OSH. No GIV foi implantada a biocerâmica β HA/TCP de absorção rápida em grânulos de 40-60 *mesh* nos membros pélvicos direito e esquerdo; no GV (GV), a β HA/TCP de absorção lenta em grânulos de 40-60 *mesh* nos membros direito e esquerdo e o GVI constituiu o grupo controle não submetido a OSH, sendo que nos membros direito e esquerdo os defeitos permaneceram vazios.

Seguiu-se a sutura de cada um dos diferentes planos cirúrgicos (fáscia, subcutâneo e pele). A fáscia e o tecido subcutâneo foram aproximados com fio absorvível de ácido monocryl 5-0 em padrão contínuo simples. A dermorráfia foi realizada por pontos simples separados com nylon monofilamentar 6-0.

Foram realizadas avaliações clínicas diárias durante os 10 primeiros dias, considerando aumento de volume, temperatura local, estabilidade óssea e deambulação. Foram administrados 5 mg/Kg de morfina a cada 4 horas no primeiro dia pós-operatório, via subcutânea e Meloxicam 0,2 mg/kg, via subcutânea a cada 24 horas durante três dias (Comite de Ética no Uso dos Animais, UFMG).

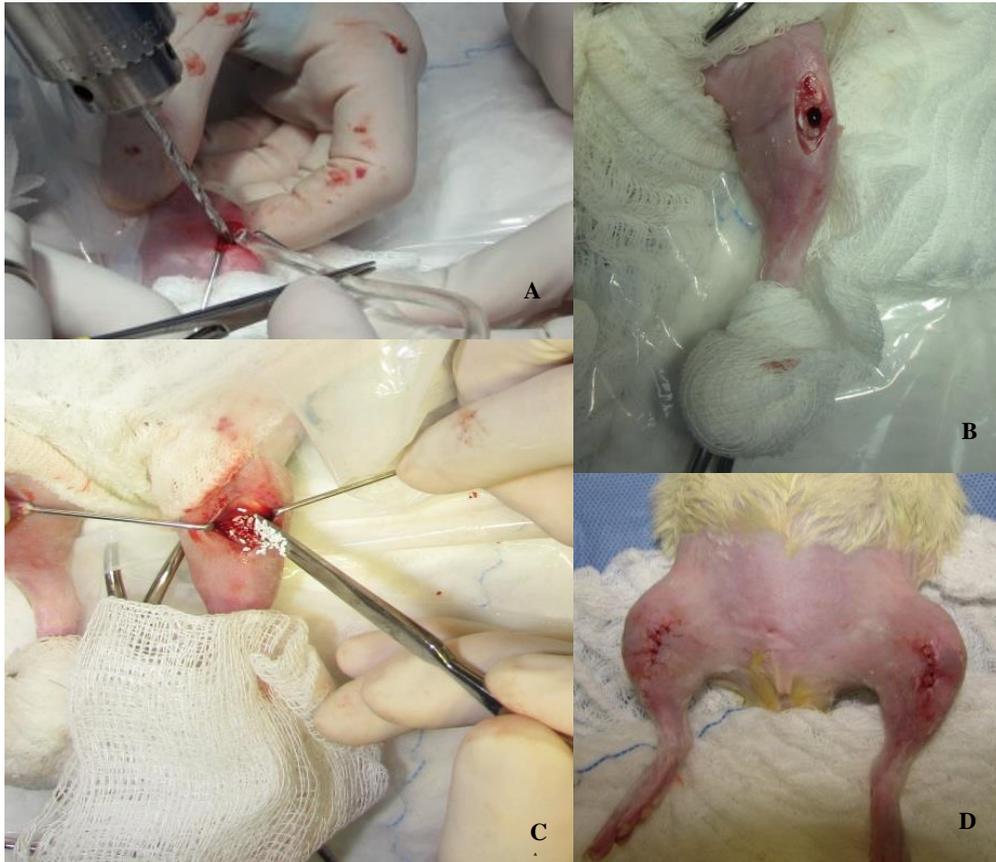


Figura 8. Procedimento cirúrgico em ratos wistar. A) Criação de falha óssea com auxílio de uma broca e furadeira pneumática sob irrigação contínua com solução de cloreto de sódio 0,9 % estéril. B) Defeito no terço proximal da tíbia. C) Preenchimento com biocerâmica β HA/TCP de absorção rápida e lenta. D) Demorrafia após criação de defeito nos membros pélvicos.

3.2.3. Avaliação da densidade óssea Radiográfica

As avaliações radiográficas da densidade óssea foram feitas nas posições crânio-caudal e médio-lateral da tíbia proximal antes da intervenção (tempo 0), imediatamente após (Fig. 9), aos 15 (tempo 1) e 30 dias (tempo 2). Todas as radiografias foram feitas utilizando 55 kv e mAs 0,006, no aparelho de Raios x digital da Escola Veterinária da UFMG.

Em face do estudo de animais com osteopenia utilizou-se também o parâmetro da densidade óssea radiográfica, considerando a intensidade de pixels, numa escala de 0 (preto) a 255 (branco).

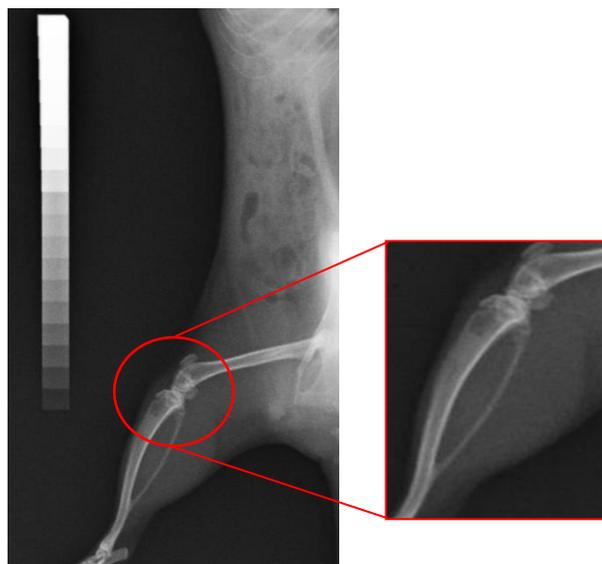


Figura 9. Projeção radiográfica médio- lateral da tibia de rata wistar após a criação de defeito ósseo no terço proximal da tibia.

As imagens digitais obtidas foram arquivadas em formato TIFF a 8bits numa matriz de pixels de 2010 x 2447 e tamanho de 4.7 MB. No programa *Image J* foi criada uma área de interesse no formato de retângulo, com mensuração de 800 pixels, correspondente à área de estudo da qual se obteve os níveis médios de cinza do terço proximal das tíbias para confirmação de osteopenia, de acordo a metodologia descrita no capítulo II.

3.2.4. Avaliação histológica

As avaliações histológicas foram realizadas aos 15 (tempo 1) e 30 dias (tempo 2). Os animais foram sedados com 40 mg/Kg de cloridrato de cetamina e 5 mg/Kg de xilazina via intraperitoneal, seguido de lidocaína na dose de 7 mg/Kg e após cinco minutos foram submetidos a eutanásia por sobredose anestésica utilizando tiopental sódico (100 mg/kg) via intraperitoneal.

Ao exame macroscópico foram avaliados os aspectos locais como cor, aspecto do tecido local, presença de fibrose, calo ósseo e mobilidade. Após a remoção dos tecidos moles, as tíbias foram colhidas e fixadas em formalina a 10% tamponada. Posteriormente, cada fragmento ósseo foi envolvido em gaze e identificado para descalcificação em solução de ácido fórmico a 24% com citrato de sódio durante 30 dias. Todas as amostras foram colocadas no mesmo recipiente e imersas na solução descalcificadora. A solução foi trocada a cada 48 horas até a comprovação radiográfica de completa descalcificação do tecido aos 30 dias.

Após a descalcificação as amostras foram lavadas por 24 horas em água corrente para então serem desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, absoluto 1), permanecendo duas horas em cada um deles. Posterior à desidratação, os fragmentos foram diafanizados em xilol durante 40 minutos, embebidos em parafina líquida por 40 minutos,

incluídos em blocos de parafina e obtidos cortes de 3 µm de espessura. As amostras foram coradas com Hematoxilina-Eosina segundo o procedimento padrão para observação por microscopia óptica de luz.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Uma vez que a média dos valores de pixels das regiões de controle foram semelhantes entre si, dentro de cada grupo, não foi aplicado nenhum fator de correção para a variabilidade.

A análise das médias dos grupos mostrou redução dos valores de pixels no grupo OSH, mostrando diferença significativa entre o dia zero e as avaliações subsequentes, indicando perda óssea.

Em contrapartida no grupo controle verificou-se aumento significativo nos valores de pixels entre o dia zero e o dia 15. Ao se comparar os grupos observa-se diferença significativa entre os mesmos a partir do dia 15 de avaliação (Tabela 4), onde a densidade radiográfica no grupo OSH se encontra no intervalo de 147,94 e no grupo controle os valores oscilam na média de 184,70. A diferença entre os grupos se manteve até o dia 30.

Tabela 4. Densidade radiográfica em pixel de ratas castradas e não castradas aos 0, 15 e 30 dias de avaliação.

	Tempo de Avaliação		
	Dia 0	Dia 15	Dia 30
Grupo controle	162,49± 3,10 Ab	184,70± 2,32 Aa	173,97± 3,52 Aab
Grupo OSH	162,75± 3,49 Aa	147,94± 3,24 Bb	149,25±4,09 Bbc

Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúscula na linha. Anova e pós-teste Tukey, média e erro padrão da média (p>0,05).

Após a implantação da biocerâmica foram feitas avaliações radiográficas para mensuração da densidade radiográfica óssea na área de interesse imediatamente após a criação do defeito e implantação da biocerâmica, aos 15 e 30 dias.

Ao se comparar a densidade radiográfica imediatamente após a criação do defeito e aos 15 dias nos animais do grupo OSH observou-se aumento a partir de sua condição de densidade radiográfica baixa, 138,89 pixels; no grupo controle ao igual que no grupo com osteopenia, evidenciou-se um aumento na densidade radiográfica nas ratas sadias a partir da média de 155,35 pixels (Fig. 10).

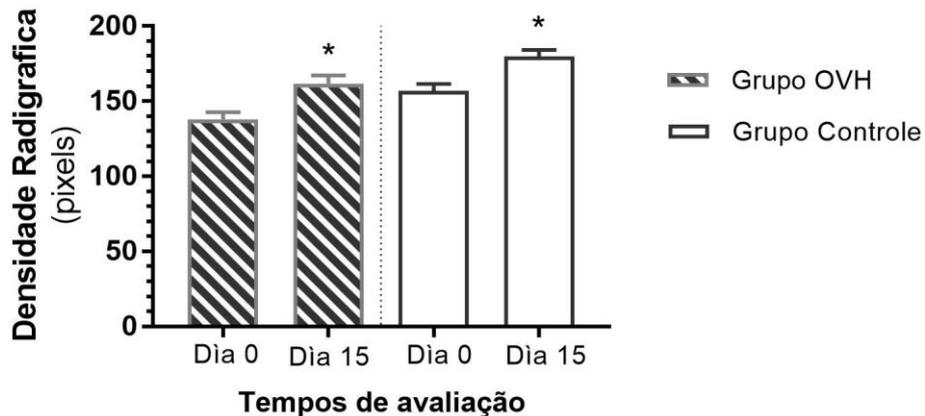


Figura 10. Densidade óssea radiográfica em ratos wistar nos grupos defeito vazio aos zero e 15 dias após criação do defeito na tíbia proximal.

Tabela 5. Densidade óssea radiográfica em ratos wistar nos grupos defeito vazio aos zero e 15 dias após criação de defeito em tíbia proximal.

	Tempo de Avaliação	
	Dia 0	Dia 15
Grupo controle	152,61± 3,92 Cb	180,47± 3,98 Aa
Grupo OSH	138,89± 3,31 Cb	162,36± 3,55 Ba

Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúscula na linha. Anova e pós-teste Tukey, média e erro padrão da media ($p > 0,05$).

Nas avaliações dos grupos com biocerâmica não se observou diferença em relação as duas cerâmicas nem entre os tempos de avaliação nos grupos (Fig. 11, 12).



Figura 11. Projeção radiográfica de ratos wistar após implantação da biocerâmica HA/TPC de absorções rápida e lenta. Grupo controle não submetido a OSH com biocerâmica de absorção lenta (A) e rápida (B). Grupo OSH com biocerâmica de absorção lenta (C) e rápida (D)

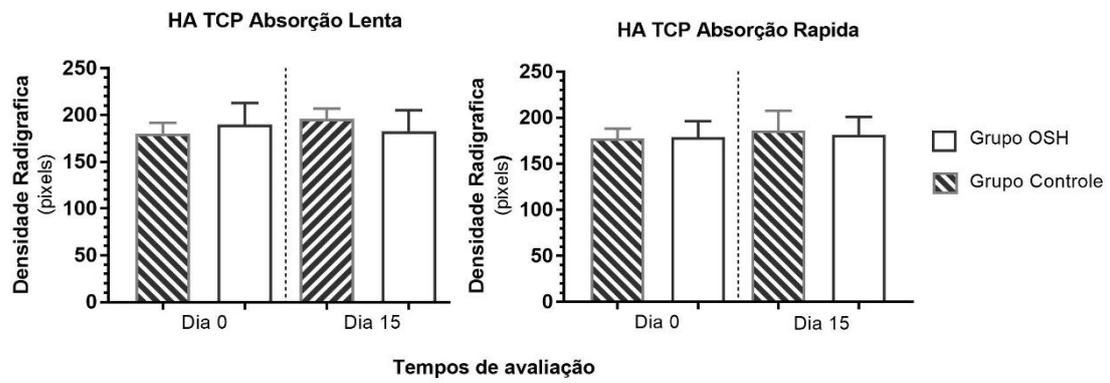


Figura 12. Densidade óssea radiográfica em ratos wistar com e sem osteopenia induzida aos zero e 15 dias após implantação de biocerâmica de absorções lenta e rápida

3.3.2. Avaliação histológica

A avaliação histológica da epífise tibial evidenciou a alteração óssea pretendida. No grupo controle foram observadas trabéculas espessas e confluentes demonstrando o estado normal dos ossos.

No grupo OSH verificou-se intensa redução das trabéculas com adelgaçamento e fragmentação das mesmas, associado com uma cobertura osteoblástica diminuída quando comparado ao grupo controle, caracterizando o estado osteopênico (Fig. 13).

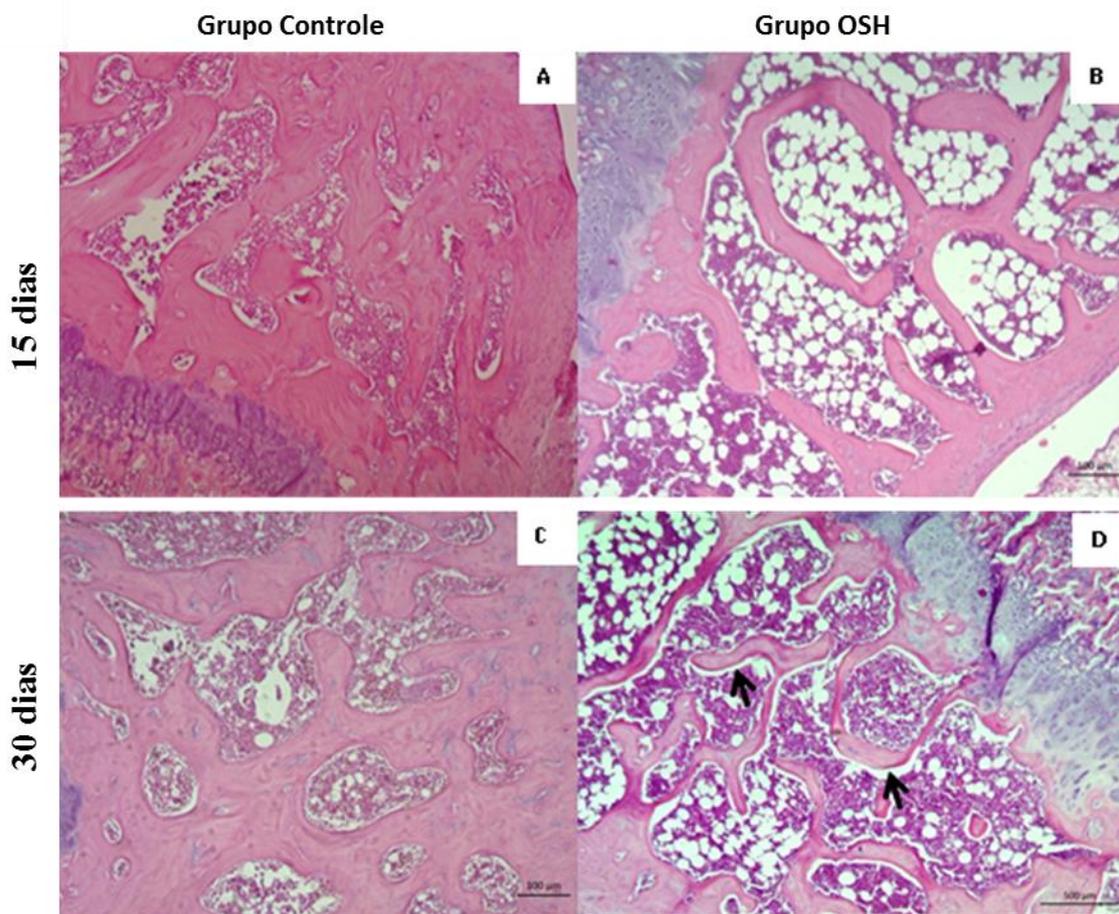


Figura 13. Fotomicrografia da epífise tibial de ratas wistar aos 15 (A,B) e 30 dias (C,D) após criação de defeito ósseo no terço proximal da tibia. Presença de trabéculas espessas e confluentes demonstrando o estado normal do osso no grupo controle (A,C). Grupo OSH com intensa redução de trabéculas com adelgaçamento e fragmentação das mesmas, e cobertura osteoblástica diminuída (setas) característico no processo de osteopenia (B,D) (HE; 5X).

Verifica-se a presença de tecido osteóide e vasos sanguíneos preenchendo a totalidade do defeito e evidente formação de tecido ósseo mineralizado com linhas de cimentação a partir do interior dos grânulos da biocerâmica e não especificamente do osso pré-existente como observado nos grupos com defeito vazio (Fig. 14). Isso se fez presente tanto nos animais com osteopenia quanto nos controle. No grupo com biocerâmica de absorção lenta bem, como naquele de absorção rápida nos animais com osteopenia observou-se alta atividade osteoblástica, com presença de células cubóides e osteócitos com núcleos grandes alojados em lagunas alargadas. Nos animais com defeito vazio observou-se presença de tecido neoformado a partir da cortical pré- existente (Fig. 14- C).

Aos 30 dias observou-se maior evolução do processo de reparação em relação aos 15, em todos os grupos. No grupo com osteopenia houve maior substituição do tecido osteóide por mais áreas de tecido ósseo mineralizado, tendendo a osso compacto, formação de trabéculas confluentes, presença de vasos sanguíneos, grande quantidade de osteócitos em lacunas alargadas e linhas de cimentação. O grupo de animais com a biocerâmica de absorção rápida mostrou uma neoformação mais organizada tendendo a continuidade cortical (Fig. 14- G, J). No grupo de β HA/TCP de absorção lenta o tecido se mostrou mais desorganizado e com retração em direção ao canal medular (Fig. 14- H). Nas áreas de osso neoformado observou-se áreas de formação concêntricas em todos os grupos com biocerâmica. No grupo do defeito vazio foi observada a formação de uma cortical fina, porém com áreas descontínuas (Fig.14- I, L) e com tecido conjuntivo no restante do defeito.

Nos grupos controle, animais não castrado e alimentados com dieta comercial, com β HA-TCP de absorção lenta e rápida verificou-se o mesmo tipo de neoformação do grupo com osteopenia. A área do defeito se encontrava preenchida completamente por tecido osteóide com presença de trabéculas mais espessas no dia 30 em comparação com o dia 15 (Fig. 15- G, H). No grupo em que o defeito permaneceu vazio, aos 15 dias observou-se continuidade cortical fina e em alguns casos descontínua (Fig.15- C, F), já aos 30 dias havia continuidade cortical, porém ainda fina em alguns pontos(Fig. 15- I, L).

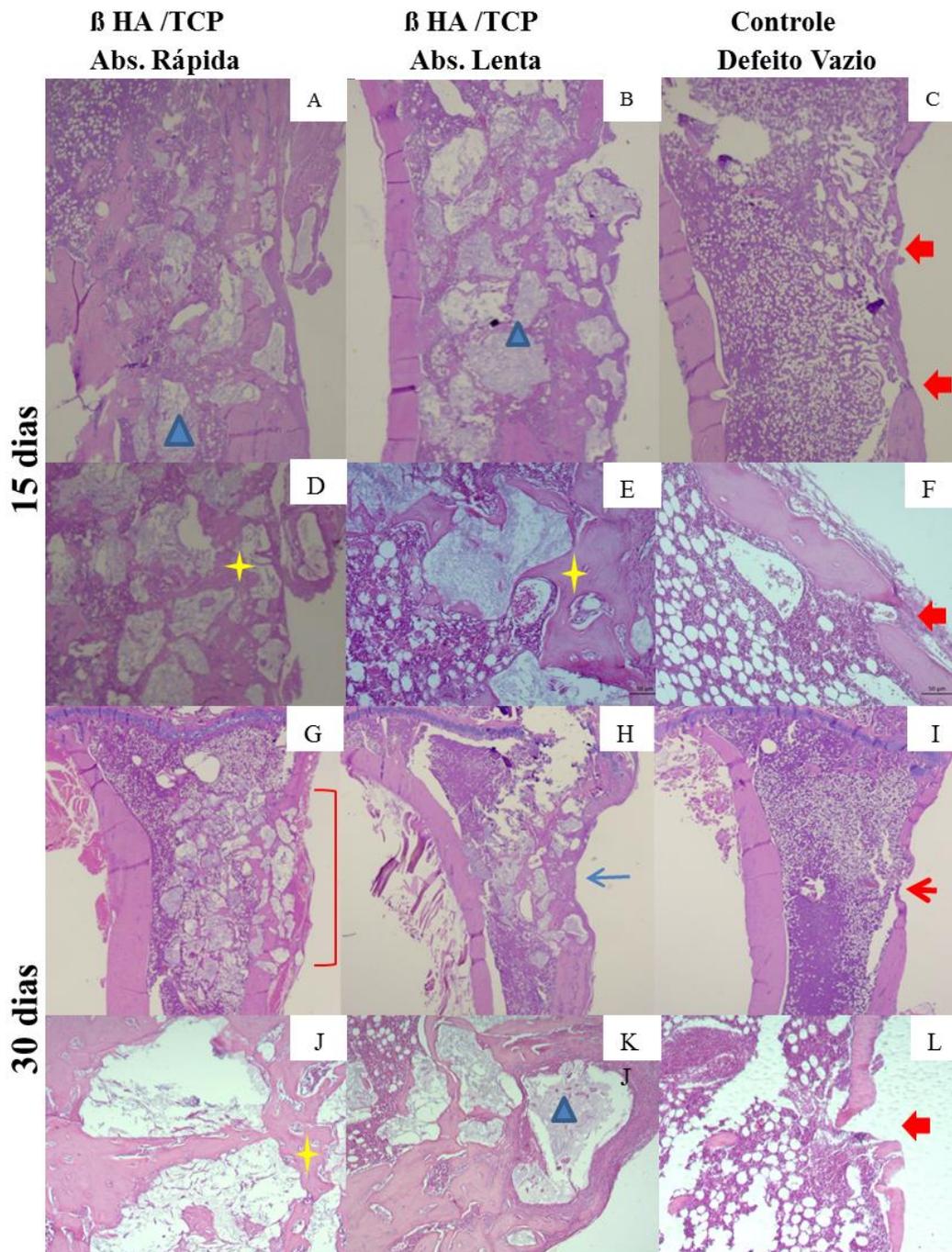


Figura 14. Fotomicrografia de defeito ósseo no terço proximal da tíbia em ratos wistar submetidas a OSH e dieta hipocalcêmica após 15 e 30 dias da implantação de biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, D, G, J) e lenta (B, E, H, K). Observa-se grande quantidade de tecido osteóide em todos os grupos. Tecido osteóide e formação de trabéculas (estrela) em volta e no interior dos grânulos da biocerâmica (triângulo). No grupo controle, defeito vazio (C, F, I, L) a formação de uma cortical fina ainda não completa a partir do osso preexistente (setas vermelhas) (HE- 3.2 X, 20X). Observa-se na biocerâmica de absorção rápida aos 30 dias, neoformação mais organizada tendendo a continuidade cortical (G- aspa vermelha) e na biocerâmica de absorção lenta uma neoformação com retração em direção ao canal medular (H- seta azul).

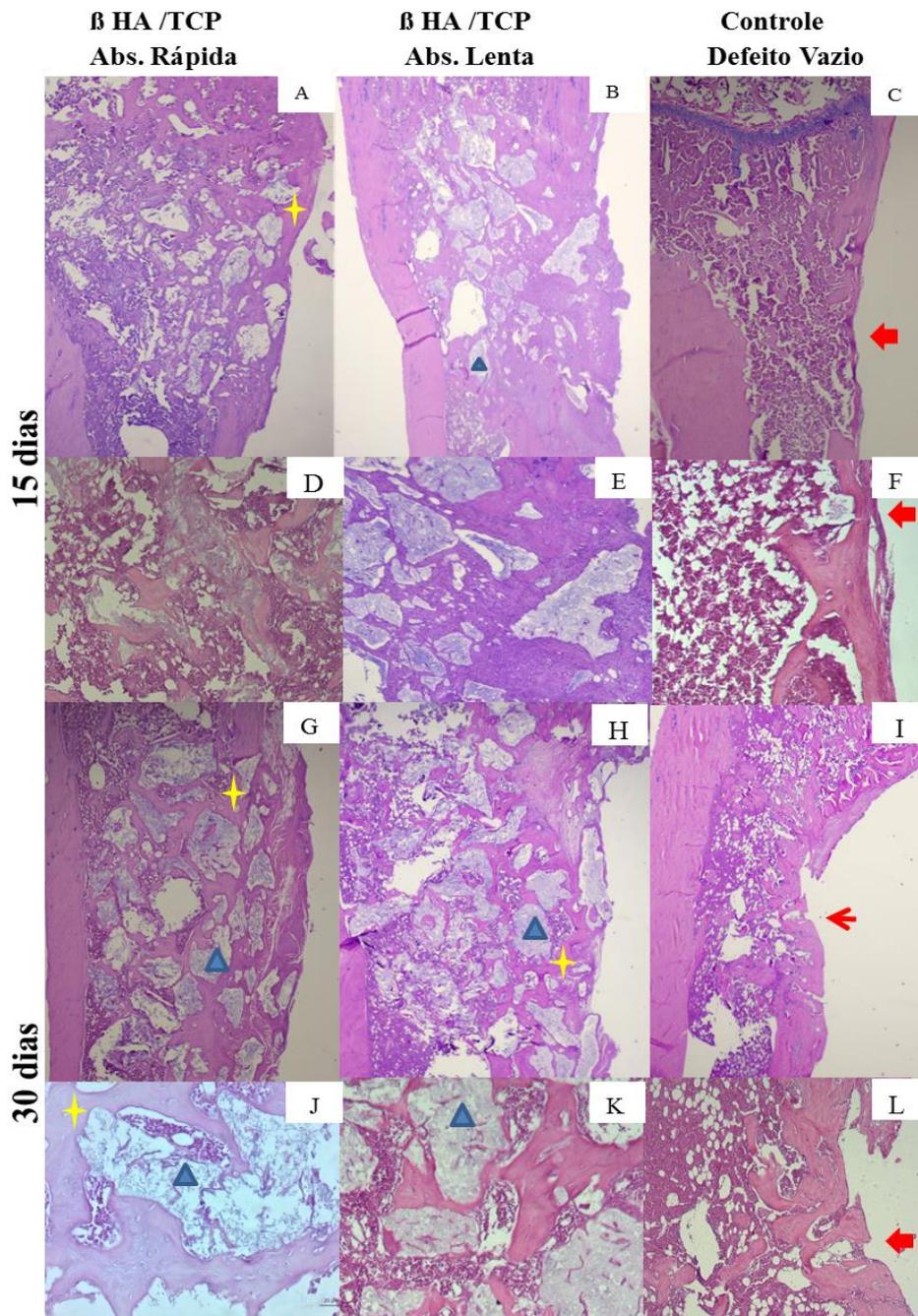


Figura 15. Fotomicrografia de defeito ósseo no terço proximal da tíbia em ratas wistar grupo controle, não castradas e alimentadas com dieta comercial após 15 e 30 dias da implantação de biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, D, G, J) e lenta (B, E, H, K). Observa-se grande quantidade de tecido osteóide em todos os grupos. Tecido osteóide e formação de trabéculas (estrela) em volta e no interior dos grânulos da biocerâmica (triângulo azul). No grupo controle a formação de uma cortical muito fina ainda não completa a partir do osso preexistente aos 15 dias e a formação de uma cortical fina em alguns lugares aos 30 dias (setas vermelhas) (HE, 3.2 X, 20X).

3.4. DISCUSSÃO

A avaliação da densidade radiográfica é uma ferramenta de fácil acesso e de baixo custo (Schmitd 2005; Antonietto et al., 2012), que possibilita seu emprego para determinação da qualidade óssea. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados para garantir a fidelidade do método de avaliação. Nesse estudo, a padronização da dosagem e das projeções permitem minimizar os possíveis erros, como relatado por Schmitd (2005) que cita como principal erro a inserção de ruído proveniente da não padronização das tomadas. Esta ferramenta possibilita identificar precocemente, o quadro de osteopenia.

A densidade óssea radiográfica mostra, já a partir dos 15 dias, a diminuição da densidade característica da osteopenia, permite acompanhar as lesões e perdas ósseas como mostrado nos grupos com osteopenia. Nos grupos com implante, entretanto a mensuração de densidade óssea não se mostrou favorável, uma vez que não foi possível quantificar na escala de 0-255 pixels. Isso se deve à densidade do biomaterial, também de difícil avaliação por exame radiográfico como relatado por Castro-Varon (2013), ao avaliar continuidade cortical na reparação de defeitos críticos com β HA /TCP de absorção rápida em coelhos saudáveis. A avaliação por meio de densidade radiográfica em pixels pode se mostrar mais efetiva na análise de biomateriais como biovidros e silicatos entre outros (Aristizabal, 2013; Castro-Varon, 2013)..

Um dos grandes desafios em ortopedia é a cura óssea ou fixação de próteses em pacientes idosos ou osteoporóticos. Pesquisas são realizadas com vistas ao desenvolvimento de biomateriais que possam favorecer esta resposta local e reduzir o tempo de recuperação bem como a taxa de insucesso. A biocerâmica bifásica β HA /TCP (EINCO®) permite elaborar biomateriais com taxas de reabsorção diferentes para o tratamento de perdas ósseas em pacientes com diversas condições clínicas (Lobo, 2011; Aristizabal, 2013; Castro-Varon, 2013).

A formação de rede vascular e de matriz óssea entre os poros da biocerâmica desde o primeiro tempo de avaliação, como observado neste estudo foi também relatado por Lobo et al., (2009) e Lobo e Arinzeh (2010) Lobo, 2011, Aristizabal (2013) e Castro-Varon (2013). Segundo os autores, a presença dos poros permite a deposição das células e a condução do processo por haptotaxia, favorecendo a regeneração como demonstrado neste estudo e já relatado por Aristizabal (2013) e Castro-Varon (2013) após o emprego do mesmo material com diferentes taxas de absorção na reparação de defeitos críticos ósseos em coelhos clinicamente saudáveis.

A evidente formação de tecido mineralizado com osteócitos em lacunas alargadas e linhas de cimentação, já a partir de 15 dias mostra o processo de regeneração por aposição dentro dos grânulos do biomaterial mesmo em animais com osteopenia, acompanhando o tipo de regeneração observada nos animais sem osteopenia.

As características da cortical nos grupos tratados, com ou sem osteopenia, com grande quantidade de matriz óssea, em contraste com a cortical fina nos defeitos sem preenchimento,

mostra o efeito benéfico indubitável do implante β HA /TCP de absorção rápida e lenta, com ação semelhante nos grupos com osteopenia e ausência de reação de corpo estranho ou rejeição.

A continuidade cortical observada nos grupos com defeito vazio sem osteopenia é esperada, já que o defeito trabalhado não se configura um defeito crítico. Para avaliações de implantes e regeneração em modelos animais de menor tamanho como o rato, faz-se necessária a padronização do defeito crítico como discutido por Poser et al. (2014). Defeitos em ossos longos na faixa de 5 mm e monocorticais como o deste estudo, não permitem uma análise completa do real efeito do implante, já que todos os controles com ou sem osteopenia mostram recuperação.

3.5. CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento e com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

A biocerâmica β HA/ TCP de absorções rápida e lenta pode ser indicada para o tratamento de defeitos em animais com osteopenia.

A biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida favorece uma regeneração óssea mais organizada em relação àquela de absorção lenta em animais com osteopenia.

A densidade dos grânulos da β HA/TCP não permite o emprego da densidade óssea radiográfica por pixels.

3.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

A continuação de pesquisas com as cerâmicas β HA/TCP de absorções rápida e lenta com avaliações mais detalhadas e em defeitos ósseos críticos se faz necessária, com vistas a se obter parâmetros para indicação específica em casos de rarefação óssea. Isto permitirá obter a parametrização para o emprego das biocerâmicas em animais doentes, pacientes pediátricos e geriátricos, bem como em pacientes do sexo feminino e masculino em condição clínica desfavorável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIENS, P.A. Preservation of bony sites. Em: Proceeding of the 3rd European workshop on periodontology, 1999, Berlin: Quintessence. Implant dentistry. Lang NP, Karring T, Lindhe J (eds), p.266-280.

AL-AQL, Z.S. et al. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*, v. 87, n. 2, p.107-118, 2008.

ANTONIETTO, E.; COELHO, J.C.A.; BIFFE, G.; CARVALHAL, R. et al. Alterações da densidade mineral óssea em vértebras de ratos Wistar submetidos à ausência de carga nos membros pélvicos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.49, n.3, p.185-192, 2012.

ALLEN, M.J. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, v.32, n.3, p.101-113, 2003.

ARISTIZABAL, O.L.P. Biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos em defeito crítico em rádio de coelhos (*oryctolagus cuniculus*) 2013. Tesis doutoral (doutorado em ciência animal). Escola de Veterinaria, Universidade federal de minas gerais. Belo Horizonte.

ARIFIN, Z. HESTIANTORO, A. BAZIAD, A. Pemberian susu yang difortifikasi kalsium kadar tinggi dan vitamin D dalam memperbaiki turnover tulang perempuan pascamenopause. *Maj Obstet Ginekol Indones.*, v. 34, p. 31-38. 2010

ATMACA, H. AYDIN, A. MUSAOĞLU, R. Experimental model of osteoporosis: comparison between ovariectomy and botulinum toxin A. *Acta Ortop Brasileira*. v. 21 n. 6. P.340-343. 2013

BIKLE, D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am J Med.*, v.103, p.427-436, 1997.

BIKLE, DD.; HALLORAN, BP.; MOREY-HOLTON, E.; Space flight and the skeleton: lessons for the earthbound. *Endocrinologist*. v.7 n 1 p.10-22. 1997

BIOCERAMICA para reconstrução óssea. Belo Horizonte: EINCO, 2011. 13p. (Relatório Técnico).

BRONCKERS, A; GAY S, FINKELMAN; RD, BUTLER WT. Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Mineral.*, v.2, p.361-373, 1987

CAMARA, C.; LINYUAN, Z.; DONG, Y.; YAOWU, Z. et al. Serum osteocalcin levels and bone mineral density in ovariectomized rats. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, v.5, n. 1, p.1-8, 2014.

CASTRO-VARON, J.A. Biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida no preenchimento de defeito crítico em rádio de coelhos (*oryctolagus cuniculus*). 2013. Dissertação (mestrado ciência ambiental). Escola de veterinária- Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. Diagnosis, Prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am. J. Med.*, v.94, p.646-650, 1993.

CHAILWHITH, PIASEU, N.; SAETUNG. Biochemical Markers of bone turnover and response of BMD to intervention in early post-menopausal women. *Clin. Chem.*, v.47, p.1083-1088, 2001.

CIVITELLI, R.; ARMAMENTO-VILLAREAL, R.; NAPOLI, N.; Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporosis Int.*, v.20, p.853-851, 2009.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif. Tissue Int.*, n.52, p.26-33, 1993

DAO TT, ANDERSON JD, ZARB GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants. *Int J. Oral Maxillofac. Implant.*, v.8, p.137-42, 1993.

DEFTOS, L.J.; PARTHEMORE, J.G.; PRICE, P.A. Changes in plasma bone GLA protein during treatment of bone disease. *Calcif Tissue Int.* v. 34, n. 2, p. 121-124, 1982.

DELMAS, P.D. Bone marker nomenclature. *Bone*, v.28, p.575, 2001.

DEQUEKER, J. NSAIDs/corticosteroids - primum non nocere. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 455, p.319–25, 1999.

EASTEL R, BLUMSONH A. The value of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J. Rheumatol*; v. 24: 1215-7. 1997.

EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E.; Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis Int.*, v.16(Suppl 2) p.129-138. 2005

ERIKSEN, E.F.; Normal and pathologic remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of remodeling sequence in normal and metabolic bone disease. *Endocr Rev.*, v.7, p.379- 408, 1986.

FELDMAN, E.C. Hiperadrenocorticism. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. V.2, cap.154, p.1539-1568.

FERREIRA, F.B.A.; VALE, M.S.; TAVANO, O. Radiopacidade de cimentos endodônticos avaliados pelo sistema de radiografia digital. *Rev FOB.*, n.7, p.55-60, 1999.

GARNERO P, DELMAS PD. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, v.4, p.50-63, 2004.

GARCÍA-DENCHE, J.T.; influencia del plasma rico en plaquetas en la regeneración Ósea: estudio densitométrico y Morfométrico en calota de conejas osteoporóticas. 2006. Tesis doctoral. Universidad Rey Juan Carlos, España.

GARRIDO, C.A.; LOBO, S.E; TURÍBIO, F.M.; LEGEROS, R.Z. Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Orthopaedic Reconstructions: Clinical Outcomes. *International Journal of Biomaterials*, 2011.

GARRIDO C.A., SAMPAIO T.C. Use of bioceramics in filling bone defects. *Revista Brasileira de Ortopedia.*, v. 45, n. 4, 2010.

GERSTENFELD, L.C.; CULLINANE, D.M.; BARNES, G.L.; GRAVES, D.T.; EINHORN, T.A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.*,v. 88, p.873–884, 2003

GLOWACKI, J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Rel Res.*, v.35, p.82- 89, 1998.

GNDBERG, C.M. Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med.*, v.20, n.3, p.489-501, 2000.

HARTKE, JR.; Preclinical development of agents for the treatment of osteoporosis. *Toxicol Pathol.*, v.27, n.1, p.143-147. 1999.

HENN. J.D. BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2010.

HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 18ª Ed. Brasil: Editora Manole LTDA, 1678 p. 1995.

HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BRUDER, S.P. Biology of bone healing:its impact on clinical therapy. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Illinois:Quintessence, 1999, p.17-53.

IJIRI, K.; MA, Y.F.; JEE, W.S.S. et al. Adaptation of nongrowing former epiphyses and metaphyseal bones to aging and immobilization in the rat. *Bone*, n.17, p.207-212, 1995.

IKI, M.; AKIBA, T, MATSUMOTO T. ET AL. and Jpos Study Group. Reference database of biochemical markers of bone turnover for the Japanese female population. *Osteoporos Int.*, v.15 p.981- 991. 2004;

JEE, W.S.S.; MA, Y.F. Animal models of immobilization osteopenia. *Morphologie*, n.83, p.25-34, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.; *Histologia Básica*. 11ª Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KALAISELVI, V.S.; PRABHU, K.; MANI RAMESH et al. Association of Serum Osteocalcin with Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. *J Clin Diagn Res.*, v.7, p.814–816, 2013

KELLEY, G.A.; KELLEY, K.S. Efficacy of resistance exercise on lumbar spine and femoral neck bone mineral density in premenopausal women: a meta-analysis of individual patient data. *J. Womens. Health*.v.13, p.293-300, 2004.

- KIM, T.H.; JUNG, J.W.; HÁ, B.G.; HONG, J.M.; PARK, E.K.; KIM, H.J. et al. The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. *J Nutr. Biochem.* v.22, p.8–15, 2011.
- KON, T.; CHO, T.J.; AIZAWA, T. et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, v, 16, p.1004–1014, 2001
- LEE, A.J.; HODGES, S.; EASTELL, R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem.* v. 37, p.432-46, 2000.
- LELOVAS, P.P.; XANTHOS, T.T.; THOMA, S.E.; LYRITIS, G.P.; DONTAS, I.A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.*, v.58, n.5, p.424-30, 2008.
- LIAN, J.B.; FRIEDMAN, P.A. The vitamin K-dependent synthesis of gamma-carboxyglutamic acid by bone microsomes. *J Biol Chem.*, v. 253, p.6623-6626, 1978.
- LOBO, S.E; ARINZEH, T.L.; Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials*, v. 3, p. 815 – 826, 2010.
- LOBO, S.E.; WYKROTA, F.H.; OLIVEIRA, A.C.; et al., Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects. *J. Mater Sci. Mater Med.* v. 20, n.5, p.1137-1147, 2009.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 375, 2002
- MARSELL, R, EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. *Injury*, Jun v. 42, n.6, p. 551-555, 2011
- MILLER, S.C.; BOWMAN, B.M.; JEE, W.S. Available animal models of osteopenia--small and large. *Bone*, v.17, p.117–123, 1995.
- MOLINA, F.M. Efecto del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) en la regeneración en tejidos blandos y tejido óseo. Estudio experimental en conejos albinos de Nueva Zelanda, Tese doutoral. Escola de Medicina e Odontologia - Universidade de Murcia, 2008.
- MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Rel Res.*, v.395, p.66-80, 2002.
- MUSSO, C.; MINGOTE, E.; DURANTE, C.; BRENTA, G. et al. Correlación entre osteocalcina, insulinoresistencia, insulinosensibilidad y metabolismo de la glucosa en adultos mayores con síndrome metabólico. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, v.52, n.1, p.8-13, 2015.
- NELSON, R.W., COUTO, C.G. Distúrbios da glândula adrenal. In:____. (Ed.). *Medicina interna de pequenos animais*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap 53, p.610-633.
- OCARINO, N. M.; Atividade física no tratamento da osteoporose: histomorfometria do esqueleto axial e apendicular de ratas. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- OCHANDIANO C.S. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales aloplásticos. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.*, v. 29, n. 1, 2007 .
- OKUMURA, H.; YAMAMURO, T.; KASAI, R.; ICHISAKA, A. et al. The effects of immobilization on osteoporosis in rats. *Jpn. J. Bone Miner. Metab.*, n.4, p.75-81, 1986.
- PATARO, A.L. Avaliação biológica de compósitos de polímeros biodegradáveis em uma matriz de biocerâmica com adição de tetraciclina. 2005. Dissertação (Mestrado em clínica odontológica). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
- PARK, S.B.; LEE, Y.J.; CHUNG, C.K. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model : stepwise description of double dorso-lateral approach. *J Korean Neurosurg Soc.*, v.48, p.309–312, 2010
- PASQUALI, A.A.G.;MATSON, M.R.;RAITZ, R. Estudo comparativo da densidade radiográfica de cimentos resinosos. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.*, v.21, n.3, p.239-243, 2009.
- PEREZ, R; SEGURA, M.C. Regulación del metabolismo mineral PHT, calcitonina y vitamina D. En : Dieguez, C; Yturriaga, R (eds) *Metabolismo fosfocalcico. Actualizaciones en endocrinología.* Mc Graw Hill, interamericana, Madrid, 2003.
- PIERMATTEI, D.L., FLO, G.L. *Handbook of small animal orthopedics and fracture treatment.* 3.ed. Philadelphia : Saunders, 1997, p.516-580.
- POSER, L.; MATTHYS, R.; SCHAWALDER, R.; PEARCE. S. A. et al. Standardized Critical Size Defect Model in Normal and Osteoporotic Rats to Evaluate Bone Tissue Engineered Constructs. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, v.2014
- PRICE, P.A.; PARTHEMORE, J.G.; DEFTOS, L.J. New biochemical marker for bone metabolism: measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest.*, v.66, p.878-883, 1980
- QUESENBERRY, K; CARPENTER, J.W. *Ferrets, Rabbits and Rodents - Clinical Medicine and Surgery* 2nd Edition. St. Louis, Missouri: Saunders, 2004, 441-442p.
- RAITZ, R.; CURI, M.; DIB, L; FENYO-PEREIRA, M. Conventional and indirect digital radiograph interpretations or oral unilocular radiolucent lesions. *Dentomaxillofac Radiol.*, v. 35, n.3, p. 165-169, 2006.
- RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, L.J. 3rd Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.*, v.23, p.279–302, 2002
- SARAIVA, G.L; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.*, v. 46, n. 1, . 72-78, 2002.
- SCHMITD, L.B. Avaliação radiográfica da reabsorção óssea periodontal por meio de valor de pixel e comparação com análise histopatológica. 2005. Dissertação (mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

SERRA E SILVA, F.; ALBERGARIA-BARBOSA, J. R.; MAZZONETTO, R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.64, p.931-5, 2006.

SIQUEIRA D. Osteoporose: uma análise ultraestrutural do tecido ósseo em camundongos e57 e apoeko ovariectomizados. 2015, Tese doutoral Universidade Federal do Espírito Santo, Vitoria.

SOPHOCLEOUS, A; IDRIS, AI. Rodent models of osteoporosis. *Bonekey Reports.*, v. 3, p. 614, 2014.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; KE, H.Z. Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.*, v..17, p.125–133, 1995.

VIEIRA, J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*,v.43, p415-422, 1999.

WATTS, N.B.; JENKINS, D.K.; VISOR, J.M. et al. Comparison of bone and total alkaline phosphatase and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women treated with alendronate. *Osteoporosis International*, v. 12, p. 279-88, 2001.

WESTERLIND, K.C.; WRONSKI, T.J.; RITMAN, E.L.; LUO, Z.P.; AN, K.N. et al. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n.94, p.4199-4204, 1997.

WRONSKI, T.J.; CINTRON, M.; DANN, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue. Int.*, n.42, p.179-183, 1988.

YOON K.H; CHO, D.C.; YU, S.H.; KIM, K-T.; JEON, Y.; SUNG, J.K. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc.* v. 51, n.6, p323–327, 2012.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 277/2016

Título do projeto: Biocerâmica de hidroxiapatita e trifosfatos de cálcio de absorções rápida e lenta na reparação óssea em ratas com ou sem osteopenia experimental

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Cleuza Maria de Faria Rezende

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: **Decisão Final**

Aprovado na reunião do dia 24/10/2016.

Belo Horizonte, 01/11/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

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

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