

MARIÁ ANDRADE DE CARVALHO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE FALHAS ÓSSEAS TIBIAIS COM CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS HETERÓLOGAS ASSOCIADAS OU NÃO AO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS EM COELHAS COM HIPERCORTISOLISMO
IATROGÊNICO**

**Teresina
Piauí - Brasil
2016**

MARIÁ ANDRADE DE CARVALHO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE FALHAS ÓSSEAS TIBIAIS COM CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS HETERÓLOGAS ASSOCIADAS OU NÃO AO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS EM COELHAS COM HIPERCORTISOLISMO
IATROGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
Federal do Piauí, como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

Sanidade e Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

Co-orientador:

Prof. Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa

**Teresina
Piauí – Brasil
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

R672a Rocha, Mariá Andrade de Carvalho
Avaliação do tratamento de falhas ósseas tibiais com células-tronco mesenquimais heterólogoas associadas ou não ao plasma rico em plaquetas em coelhas com hipercortisolismo iatrogênico / Mariá Andrade de Carvalho Rocha - 2017.
69 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

1.Osteoporose 2. Densitometria 3.Células-tronco 4. Mesenquimias 5.Plasma rico em plaquetas I.Título

CDD 616.716

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE FALHAS ÓSSEAS TIBIAIS COM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HETERÓLOGAS ASSOCIADAS OU
NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM COELHAS COM
HIPERCORTISOLISMO IATROGÊNICO**

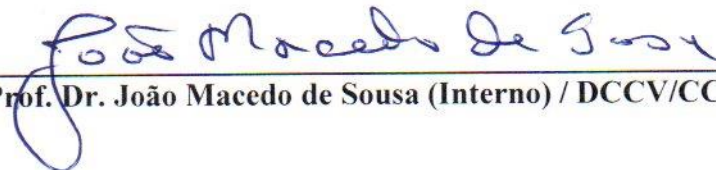
MARIÁ ANDRADE DE CARVALHO ROCHA

Dissertação aprovada em: 29/08/2016


Banca Examinadora:



Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. João Macedo de Sousa (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa (Externa) / IFPI

Dedico,

Aos meus pais, Carlos Alberto e Valéria, aos meus avós Ednilson e Prazeres, à tia Aninha, que são minha paz, força e segurança. Obrigada pelo amor de vocês.

Aos amigos e à toda minha família, pelo apoio em todos os momentos que precisei.

Agradecimentos,

A Deus, que em sua infinita sabedoria oferece-me todas as provas para o meu amadurecimento.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade de crescimento profissional.

À minha família, pelo amor, presença, palavras, cuidado, e por existir em minha vida.

Ao professor Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto, meu orientador, que me incentivou a ingressar no mestrado, e que durante o mesmo, me orientou, ajudou e ensinou. Obrigada por tudo que aprendi com você professor.

Ao meu co-orientador Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa, a doutoranda Dayseanny e os doutorandos Gustavo e Charlys, pela realização de procedimentos fundamentais para o desenvolvimento do experimento.

À uma amiga, a quem hoje tenho um grande carinho e admiração. Laís Meireles, obrigada por sua força, sensibilidade, cuidado e dedicação em todas as etapas desse projeto que realizamos juntas.

Ao professor Dr. João Macedo de Sousa, por permitir que o Hospital Veterinário Universitário fosse um suporte aos animais do experimento, no que fosse preciso.

À professora Dra. Maria Acelina Martins de carvalho por sua prontidão em ajudar em todos momentos.

À professora Dra. Silvia de Araújo França Baêta, pelo irrestrito apoio e inestimável supervisão e colaboração nas análises histopatológicas.

Ao médico veterinário Welson Andrade de Oliveira, pela colaboração na obtenção do plasma rico em plaquetas, muitas vezes dedicando de forma solícita seu tempo livre para auxiliar-me.

À toda equipe do NUPCelt, em especial o médico veterinário Hermínio, prestativo e amigo em muitos momentos, à equipe do Hospital Veterinário (Paulo, Adriano, Jonatan, Carlos, Aline, seu Neto, seu Zé, Ana, Lucinete, seu Júlio, Ramiro) que sempre estiveram de prontidão para ajudar no que fosse preciso. Aos cuidadores, Dirceu, Igor e Antônio, pela atenção e cuidados diários com alimentação e higiene dos animais do projeto.

Aos novos amigos que surgiram dessa convivência. Isadora, Aíla, Yulla, Renata, Larissy, Taís, Elis, Camila, Brenda obrigada por todas as conversas, orientações, apoio e ajuda, me acompanhando e executando comigo várias etapas importantes do meu projeto.

E a todos aqueles cuja memória trai-me em nomeá-los.

Gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ixx
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xii
INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO I.....	20
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	233
<i>Animais</i>	23
<i>Avaliação do cálcio sérico</i>	24
Densitometria óptica radiográfica	24
Indução de hipercortisolismo e osteoporose	26
RESULTADOS	237
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO	366
REFERÊNCIAS	37
CAPITULO 2.....	41
INTRODUÇÃO	43
Métodos.....	44
<i>Animais</i>	44
<i>Indução da osteoporose</i>	44
<i>Avaliação densitométrica óptica radiográfica</i>	44
<i>Obtenção de células-tronco mesenquimais heterólogas</i>	45
<i>Avaliação microscópica da interação entre células-tronco mesenquimais e esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado</i>	45
<i>Obtenção do plasma rico em plaquetas xenogênico</i>	46
<i>Delineamento experimental</i>	46
<i>Produção das falhas ósseas</i>	47

<i>Realização dos tratamentos</i>	48
<i>Densitometria óptica radiográfica das falhas ósseas</i>	48
<i>Avaliação histopatológica das falhas ósseas tibiais</i>	49
<i>Análise estatística</i>	49
Resultados	50
Discussão.....	59
Conclusão.....	65
Referências.....	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		Página
Figura 1.	Posicionamento em decúbito dorsal para incidência radiográfica crânio-caudal das tíbias de uma coelha.	25
Figura 2.	Imagem radiográfica da tíbia esquerda de uma coelha após indução de hipercortisolismo e osteoporose. A: Fratura completa oblíqua no terço distal da tíbia esquerda. B: Mesma fratura após estabilização com pino intramedular e cerclagem.	29
Figura 3.	Imagens de densitometria óptica radiográfica da tíbia de uma coelha antes e após a indução de hipercortisolismo e osteoporose. A: Antes da indução do modelo, a densidade óssea é maior que $1,375\text{cm}^3$ e menor que $1,647\text{cm}^3$. B: Após a indução do modelo, a densidade óssea é inferior a $1,375\text{cm}^3$, evidenciando perda da densidade óssea.	31
 Capítulo 2		
Figura 1.	Tíbias de uma coelha adulta saudável com falhas ósseas correspondentes aos tratamentos adotados. A: Tíbia direita. (I) CTM. (II) PRP. B: Tíbia esquerda. (III) ASSO. (IV) CTR. Esponja hemostática umedecida e seca.	28
Figura 2.	Placa de petri contendo quatro fragmentos de esponja hemostática de colágeno hidrolisado estéril, embebidas em solução de 1×10^6 CTM, 1×10^6 PRP, solução fisiológica estéril e associação entre CTM e PRP, respectivamente. *MSC = CTM	30
Figura 3.	Imagens de densitometria óptica radiográfica da tíbia de uma coelha antes e após a indução de hipercortisolismo e osteoporose. A: Antes da indução do modelo, a densidade óssea é maior que $1,375\text{cm}^3$ e menor que $1,647\text{cm}^3$. B: Após a indução do modelo, a densidade óssea é inferior a $1,375\text{cm}^3$, evidenciando perda da densidade óssea.	32
Figura 4.	Variação de alguns índices hematológicos em amostra de sangue equino submetida à concentração plasmática de plaquetas. I: Variação dos índices de hemácias e hematócrito no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). II: Variação nos índices de leucócitos e plaquetas no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). Em II a há variação anormal da curva pela presença de agregados plaquetários. *RBC = Hemácias. PLT = plaquetas	53

- Figura 5. Células-tronco mesenquimais medulares de coelho após 10 dias de cultivo com fragmento estéril de esponja hemostática de colágeno hidrolisada, fixada com paraformoldeído tamponado a 10% e coradas com May-Grunwald Giemsa. A: Colônia uniforme de células de morfologia fibroblastóide, com núcleo central, margeando o fragmento da esponja (20x). B: Maior aumento da imagem anterior. Presença de células mononucleares sobre o fragmento de esponja (40x). 54
- Figura 6. Fotomicrografia de fragmento de esponja hemostática de colágeno hidrolisado. A: Esponja sem tratamento, evidenciando a porosidade e hialinização do material. B: Corte histológico da esponja após 10 dias de incubação em cultura com células-tronco mesenquimais medulares de coelho. Identifica-se presença de célula mononuclear, de cromatina frouxa, aderida às circunvoluções da matriz da esponja (40x). 55
- Figura 7. Avaliação densitométrica óptica radiográfica de uma falha óssea tibial de uma coelha tratada com CTM e a variação da escala de cinza correspondente. A: Imagens radiográficas seriadas ao longo de 60 dias, evidenciando a variação máxima da radioluscência da falha óssea com mínima densidade (I e II) e mínima radioluscência com máxima densidade óssea (III). B: Variação da curva de graduação de cinza, correspondente à densidade óssea, ao longo de 60 dias. O tom mais escuro corresponde ao preto e possui valor 0, representando máxima radioluscência da falha óssea. O tom mais claro corresponde ao branco e possui valor máximo de 255, representando mínima radioluscência da falha óssea. A curva evidencia elevação progressiva dos tons de branco ao longo do tempo, caracterizando a elevação gradual da densidade óssea da falha analisada. 57
- Figura 8. Fotomicrografia de falhas ósseas tibiais de coelhas portadoras de osteoporose induzida após 60 dias de tratamento com esponja estéril de colágeno hidrolisada (CTR), células-tronco mesenquimais heterólogas (CTM) em esponja de colágeno (EH), plasma rico em plaquetas em EH (PRP) e associação entre CTM e PRP em EH. A: Zona limítrofe entre discreto osso compacto maduro e marcante presença de osso trabecular, sem presença de osteoblastos ativos (10x). B: Osso imaturo trabecular com organização de tecido osteóide adjacente à vasos centrais e presença acentuada de osteoblastos ativos (20x). C e D: Osso maduro compacto e formação abundante de osso trabecular, com raras figuras de osteoblastos (20x). 59

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		Página
Tabela 1	Variação do peso (kg) de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas (OSH), ao longo de 80 dias pós OSH e 60 dias após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose	28
Tabela 2.	Valores séricos de cálcio ionizável e fósforo de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas, antes e após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose	29
Tabela 3.	Intervalos de densitometria óptica radiográfica (cm ³) de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas, antes e após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose, utilizando penetrômetro de alumínio de 11 graus	32
Capítulo 2		
Tabela 1.	Escores arbitrariamente adotados para correspondência aos intervalos mensurados, em cm ³ , da densitometria óptica radiográfica de falhas ósseas tibiais de coelhas, aos 30 e 60 dias pós tratamento.	50
Tabela 2.	Intervalos de densitometria óptica radiográfica (cm ³) de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas, antes e após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose, utilizando penetrômetro de alumínio de 11 graus	52
Tabela 3.	Intervalos médios da densitometria óptica radiográfica (cm ³) do preenchimento das falhas corticais tibiais de coelhas portadoras de osteoporose, após 30 e 60 dias do tratamento com esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado (CTR), células-tronco mesenquimais (CTM), plasma rico em plaquetas (PRP) e associação (ASSO) entre ambos.	56
Tabela 4.	Aspectos gerais dos achados histopatológicos, após 60 dias, das falhas corticais tibiais de coelhas portadoras de osteoporose, tratadas com esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado (CTR), células-tronco mesenquimais (CTM), plasma rico em plaquetas (PRP) e associação (ASSO) entre ambos.	58

RESUMO

Avaliação dos tratamentos de falhas ósseas tibiais com células-tronco mesenquimais heterólogas, associadas ou não, ao plasma rico em plaquetas em coelhas com hipercortisolismo iatrogênico

O presente trabalho encontra-se estruturado em dois capítulos, que avaliam a aplicabilidade da densitometria óptica radiográfica na avaliação da osteoporose em coelhas com hipercortisolismo iatrogênico e o efeito do tratamento de lesões ósseas nas mesmas com células-tronco mesenquimais medulares heterólogas e plasma rico em plaquetas xenogênico, associados ou não, respectivamente. Para tanto, oito coelhos fêmeas foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia e corticoideterapia para indução de estado clínico de osteoporose. Produziu-se quatro falhas nas tíbias das coelhas, sendo cada falha tratada com esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado, células-tronco mesenquimais medulares heterólogas de coelhas saudáveis, plasma rico em plaquetas xenogênico obtido de equino saudável e pela associação entre células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, respectivamente. Os animais foram divididos em dois grupos, avaliados densitométrica e histopatologicamente aos 30 e 60 dias pós tratamento. A técnica de densitometria óptica radiográfica, foi eficaz em avaliar a redução de densidade óssea nas tíbias osteopênicas e a utilização da escala de cinza do software Adobe Photoshop foi eficaz em produzir um histograma de comparação entre as densidades ópticas do referencial densitométrico e da área da tíbia analisada antes e após os tratamentos propostos. Identificou-se radiograficamente consolidação da falha óssea tratada com células-tronco mesenquimais heterólogas, associada a imagem histológica de tecido ósseo maduro e imaturo, sem evidências de osteopenia, comparado aos demais grupos, nos quais estavam ainda presentes falhas ósseas com respectiva osteopenia e fibrose, denotando efeito satisfatório do primeiro em detrimento aos demais. Não foram observadas evidências histopatológicas de aumento da reabsorção óssea nos animais tratados com plasma rico em plaquetas xenogênico, sugerindo segurança no uso do mesmo de forma interespecífica. Ademais, a esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado apresentou-se como um carreador (*scaffold*) adequado às células-tronco mesenquimais e ao plasma rico em plaquetas no modelo animal apresentado, não interferindo no processo de reparação óssea.

Palavras-chave: Osteoporose, densitometria, células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas.

ABSTRACT

Evaluation of treatment of bone tibial flaws with heterologous mesenchymal stem cells, associated or not, to platelet-rich plasma in rabbits with iatrogenic hypercortisolism

This work is structured in two chapters, which assess the applicability of radiographic optical densitometry in the assessment of osteoporosis in rabbits with hypercortisolism iatrogenic and the effect of treatment of bone lesions in the same with mesenchymal stem cells medullary heterologous and xenogenic platelet-rich plasma, associated or not, respectively. Therefore, eight female rabbits were submitted to ovariectomy and corticoid therapy to clinical status induction of osteoporosis. four failures were produced in the tibias of the rabbits, each failure treated with sterile hydrolysate collagen hemostatic sponge, mesenchymal stem cells heterologous healthy rabbits, rich plasma xenogenic platelets obtained from healthy horse and the association between mesenchymal stem cells and platelet rich plasma, respectively. The animals were divided into two groups and evaluated histopathologically and densitometrically 30 and 60 days post treatment. Radiographic densitometry technique was effective to evaluate the reduction of bone density in osteopenic tibiae and use of Adobe Photoshop software gray scale was effective in producing a comparison histogram between optical densities of the densitometric referential and tibial area analyzed before and after the treatments. It was identified radiographically consolidation of bone defects treated with mesenchymal stem cells heterologous associated with histological image of mature and immature bone tissue without evidence of osteopenia, compared to other groups, in which were still present radiolucent gaps with respective osteopenia and fibrosis, denoting satisfactory effect of the former at the expense of others. histopathologic evidence of increased bone resorption in animal treated with xenogenic platelet rich plasma were observed, suggesting the use of the same security interspecific shape. In addition, sterile hydrolysate collagen hemostatic sponge is introduced as a carrier (scaffold) suitable for mesenchymal stem cells and platelet rich plasma in the presented animal model, not interfering in the process of bone repair.

Keywords: Osteoporosis, densitometry, stem cells, platelet-rich plasma.

INTRODUÇÃO GERAL

Osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum em humanos e é caracterizada por um aumento da porosidade do esqueleto resultante da redução da massa óssea, levando à fragilidade mecânica e, conseqüente, predisposição às fraturas (ROSENBERG, 2005). A Organização Mundial de Saúde a considera como um problema de saúde pública prioritário, pois estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo estão sofrendo de osteoporose, predominantemente mulheres após menopausa (AMAM, 2014; FENG LI, 2016; DA JING, 2016).

O osso é um tecido dinâmico, que está continuamente sob o processo de reabsorção e formação, atividade mediada pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente, e conhecida como remodelagem óssea (GURR, 1999). A osteoporose ocorre quando os osteoclastos criam uma cavidade excessivamente profunda que não consegue ser preenchida suficientemente ou quando os osteoblastos não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção normal. Ambas podem ocorrer simultaneamente na menopausa (PAPLER, 1997).

Múltiplas são as causas da osteoporose, dentre elas hormonais, mecânicas, genéticas e nutricionais. Nas mulheres, a osteoporose está particularmente associada à menopausa, uma vez que a diminuição de estrógenos acelera a perda óssea. Todavia, o aspecto nutricional é de extrema importância no desenvolvimento e manutenção da massa óssea e na prevenção e/ou tratamento da osteoporose.

A maioria das fraturas ocorre em mulheres idosas por várias razões: sua expectativa de vida é maior do que a dos homens; o risco de fratura aumenta com a idade; o pico de massa óssea é menor em mulheres; a menopausa acelera a perda óssea (KANIS; PITT, 1992).

A cada ano, o Sistema Único de Saúde (SUS) tem gastos crescentes com tratamentos de fraturas em pessoas idosas. Em 2009, foram R\$ 57,61 milhões com internações (até outubro) e R\$24,77 milhões com medicamentos para tratamento da osteoporose. Em 2006, foram R\$ 49 milhões e R\$ 20 milhões respectivamente. Segundo o estudo de Bortolon et al. (2011), no triênio 2006-2008, 1% dos idosos internados no Brasil apresentaram fratura de fêmur como diagnóstico principal. Os gastos totais com internações por esta causa, incluindo o valor de unidade de terapia intensiva (UTI) e o valor de órteses e próteses, representaram cerca de 2% dos gastos com internação de idosos no Brasil.

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar a densidade mineral óssea, incluindo tomografia computadorizada, absorciometria de raio-x de alta energia e fotometria radiográfica (AMAM, 2014). Contudo, estas técnicas envolvem procedimentos radiográficos especiais e apresentam custo elevado, limitando sua utilização em medicina veterinária e em modelos animais para pesquisa (RUOSI C., 2015). A densitometria óptica radiográfica utilizando o penetrômetro, associado à análise da densidade óssea por programas computacionais, é referido como uma ferramenta promissora para avaliação da osteoporose em animais (AMAM, 2014, SEVERO, 2008). Segundo FONSECA (2005) e SEVERO (2008), a técnica permite avaliar a densidade óssea com precisão e sensibilidade. Além disso, constitui-se num método de análise quantitativo, não invasivo, de baixo custo e que não requer intervenção anestésica (MURAMOTO, 2005).

Dentre os fármacos antirreabsortivos utilizados para o tratamento da osteoporose, os bifosfonatos ocupam uma posição de destaque por serem capazes de aumentar a massa óssea.

Os bifosfonatos diminuem potencialmente a reabsorção óssea porque inibem os osteoclastos maduros bem como o recrutamento de seus precursores. Entretanto, estudos recentes associam possíveis fatores de risco à utilização por longo prazo destes medicamentos. Os efeitos adversos conhecidos dos bifosfonatos, não relacionados com necrose óssea, incluem esofagite, distúrbios gastrintestinais, que podem ser graves, úlcera péptica e, ocasionalmente, dor óssea. Recentemente, diversos casos de osteonecrose maxilar têm sido associados ao uso de bifosfonatos. Pereira et al. (2004) e Martins et al (2004) relatam o caso de um paciente de 84 anos e 73 anos, respectivamente, que exibiram exposição óssea espontânea em mandíbula com um mês de evolução. Em um período de 32 meses, Gil et al (2004) diagnosticaram cinco casos de osteomielite compatíveis com osteonecrose avascular de mandíbula entre pacientes em tratamento com bifosfonatos. Migliorati (2003) também relatou cinco casos clínicos de pacientes usuários de bifosfonatos que desenvolveram necrose óssea intra-oral, todos ocorridos no período de um ano.

Dessa forma é interessante a busca por alternativas ao tratamento da osteoporose. Dentre essas alternativas, o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) vêm se destacando como uma proposta inovadora, devido a elevada plasticidade destas células e o sucesso em induzi-las à diferenciação *in vitro* em osteoblastos, o que suscita possível eficácia para o tratamento de fraturas ósseas osteoporóticas.

As CTM caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (PITTENGER et al., 1999). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo turnover e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009). Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular. Estudos anteriores já demonstraram a eficácia das CTM na consolidação de fraturas em pacientes saudáveis (BRUDER et al, 1998; ZAMPROGNO, 2007). Estes autores trataram defeitos críticos ósseos associando CTM estromais (CTMe) e plataformas de hidroxiapatita e cerâmica de cálcio e pela infusão transcutânea de CTMe na concentração de 10^7 células/mL, respectivamente. Contudo, a literatura científica carece de maiores estudos sobre o efeito das CTM sobre a reparação óssea em pacientes portadores de osteoporose.

Além desta alternativa, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido utilizado em diversos estudos com pacientes humanos e animais para estimular a cicatrização óssea (BARBOSA et al., 2008; DEL CARLO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010b). O PRP é uma fonte de plaquetas obtido pela centrifugação de sangue fresco, rico em fatores de crescimento que estimulam a mitogênese, angiogênese e maior atividade das células osteocompetentes, determinando rapidez na formação e homogeneidade óssea (DUGRILLON et al., 2002; RAGHOEBAR et al., 2005). Contudo, segundo AMADEI et al. (2006) a experiência clínica em relação à reparação óssea na osteoporose é inconsistente, dado os poucos estudos realizados sobre a temática.

O objetivo desse estudo foi avaliar eficácia terapêutica da infusão de células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, na cicatrização de falhas ósseas em coelhas osteoporóticas, por meio de densitometria óptica radiográfica e avaliação histopatológica.

REFERÊNCIAS

- Amam, A., & Rustom, J. (2014). Assessment of mandibular alveolar bone density in osteoporotic adults in Syria. *J. Dent and Oral Medicine*, 2, 26-32.
- Li, F., Zhou, C., Xu, L., Tao, S., Zhao, J., Gu, Q. (2016). Effect of stem cell therapy on bone mineral density: A meta-analysis of preclinical studies in animal models of osteoporosis. *PLoS ONE*, 11, 1-13.
- Jing, D., Hao, X., Xu, F., Liu, J., Xu, F., Luo, E., Meng, G. (2016). Effects of local delivery of BMP2, zoledronate and their combination on bone microarchitecture, biomechanics and bone turnover in osteoporotic rabbits. *Sci Rep.*, 22, 1-10.
- Ruosi, C., Querques, F., Granata, F., Colella, G., Liccardo, F., Lombardo, B., Pastore, L. (2015). Cellular and animal models for the identification of osteoporosis determinants increasing vertebral compression fractures risk. *Osteopor. Phys Act.*, 3, 2-9.
- Muramoto, C., Sterman, F. A., Fonseca Pinto, A.C.B.C. (2005). Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça poodle por meio da densitometria óptica radiográfica. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 42, 89-97.
- Pereira, W. L. A. & Cardoso, E. C. (2010). Osteoporose em bubalinos em relação à idade, à condição clínica animal e ao estado físico-químico ósseo e do cobre hepático. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 47, 159-167.
- Zamprogno H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Sci Vet.* 2007 Nov; 35: 289-290.
- Del Carlo RJ, Monteiro BS, Silva PSA, Argolo N, Serakides R. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e autoenxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. *Vet e Zootec.* 2009 Mar; 16(1): 152-160.
- Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006 Fev; 42(1): 5-12.

PLAPLER, Perola Grinberg. "Osteoporose e exercícios." *Ver. Hosp. Fac. Med Univ. São Paulo* 52.3 (1997): 163-70.

Kanis, John A., and F. A. Pitt. "Epidemiology of osteoporosis." *Bone* 13 (1992): S7-S15.

BORTOLON, Paula Chagas; DE ANDRADE, Carla Lourenço Tavares; DE ANDRADE, Carlos Augusto Ferreira. O perfil das internações do SUS para fratura osteoporótica de fêmur em idosos no Brasil: uma descrição do triênio 2006-2008 Characteristics of hospital admissions in the Unified National Health System for osteoporotic. *Cad. Saúde Pública*, v. 27, n. 4, p. 733-742, 2011.

MIGLIORATI, Cesar A. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, n. 22, p. 4253-4254, 2003.

DE ALMEIDA GIL, Roberto; DE ARAÚJO, Bertha Catherine Baere. Necrose avascular de mandíbula por bisfosfonatos. *Rev. Bras. Oncologia Clínica*, v. 1, n. 2, p. 25-26, 2004.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*, v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009.

RAGHOEBAR, Gerry M. et al. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor?. *Clinical oral implants research*, v. 16, n. 3, p. 349-356, 2005.

DUGRILLON, A. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, v. 31, n. 6, p. 615-619, 2002.

DA TRINDADE BARBOSA, Anna Laetícia et al. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.

Este trabalho encontra-se estruturado com uma Introdução geral, Referências, Capítulo I, Capítulo II, Considerações Finais. O Capítulo I apresenta organização estrutural de um artigo científico cujo título é **“Avaliação Densitométrica Óptica Radiográfica em Coelhas com Osteoporose Secundária à Privação Estrogênica e Hipercortisolismo Iatrogênico”**, sendo desenvolvido conforme as normas do periódico *“Microscopy Research and Technique”* (ISSN: 1097-0029). O capítulo II apresenta organização estrutural de um artigo científico cujo título é **“Avaliação do Tratamento com Células-tronco Mesenquimais Heterólogas e Plasma Rico em Plaquetas Xenogênico, associadas ou não, na Reparação de Falhas Ósseas em Coelhas com Osteoporose Secundária”**, sendo desenvolvido conforme as normas do periódico *“Acta Cirúrgica Brasileira”* (ISSN: 1678-2674).

CAPÍTULO I

**AVALIAÇÃO DENSITOMÉTRICA ÓPTICA RADIOGRÁFICA EM COELHAS COM
OSTEOPOROSE SECUNDÁRIA À PRIVAÇÃO ESTROGÊNICA E HIPERCOTISOLISMO
IATROGÊNICO**

A ser submetido ao periódico *Microscopy Research and Technique*
ISSN: 1097-0029
Qualis B1

AVALIAÇÃO DENSITOMÉTRICA ÓPTICA RADIOGRÁFICA EM COELHAS COM OSTEOPOROSE SECUNDÁRIA À PRIVAÇÃO ESTROGÊNICA E HIPERCOTISOLISMO IATROGÊNICO

MARIÁ ANDRADE DE CARVALHO ROCHA¹, NAPOLEÃO MARTINS ARGÔLO NETO*²

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI 64049-650,

²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil

PALAVRAS-CHAVE: coelhas, densitometria, osteoporose

RESUMO: A osteoporose é uma doença esquelética que acomete humanos e animais caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido, a qual pode ser induzida por hipercotisolismo. O diagnóstico pode ser obtido por meio da densitometria óptica radiográfica, um método não invasivo quantitativo de baixo custo. *Objetivos:* Avaliação da densidade óssea por meio da densitometria óptica radiográfica de coelhas, antes e após indução de hipercotisolismo e osteoporose. *Material e métodos:* Autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí sob número 097/14. Oito coelhas foram previamente submetidas à avaliação de cálcio ionizável sérico e densidade óssea das tíbias por densitometria óptica radiográfica. Posteriormente foram submetidas a ovariosalpingohisterectomia e administração de succinato de metilprednisolona para indução de hipercotisolismo, sendo reavaliados os níveis séricos de cálcio e densidade óssea. *Resultados:* Identificou-se redução acentuada da densidade óssea em todos os animais com hipercotisolismo e osteoporose induzida, acompanhada de aumento dos valores séricos de cálcio ionizável e exibição de fraturas espontâneas em ossos longos. *Conclusão:* O modelo demonstrou-se eficaz em induzir osteoporose, sem mortalidade, e a densitometria óptica radiográfica com uso de penetrômetro, sensível em detectar redução da densidade óssea em tíbias de coelhas. A técnica radiográfica apresenta baixa custo e relevante potencial para uso diagnóstico na medicina veterinária.

* Correspondência para: Napoleão Martins Argôlo Neto; Professor Adjunto II. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias. Campus Socopo, S/N, Teresina - Piauí 64049-550, Brasil. E-mail: argolo_napoleao@ufpi.edu.br

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, o que leva a um aumento da fragilidade do osso e um conseqüente aumento do risco de fraturas (Elkaragy e Omram, 2013; Jee e Yao, 2010; Luo et al., 2014; Wen et al., 2015). A Organização Mundial de Saúde a considera como um problema de saúde pública prioritário, pois estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo estão sofrendo de osteoporose, predominantemente mulheres após menopausa (Amam e Rustom, 2014; Jing et al., 2016; Li et al., 2016).

Em medicina veterinária há poucos dados sobre a incidência de osteoporose em animais, tendo sido descrita em cães (Calkins et al., 1956), bubalinos (Pereira e Cardoso, 2010), caprinos (Rosa et al., 2013) e em coelhos (Costa et al., 2015). Analogamente, apesar das fartas informações sobre ocorrência de osteoporose em humanos, há poucos dados no Brasil relacionados à utilização de recursos e custos para o tratamento desta enfermidade (Bracco et al., 2009; Kowalsky et al., 2001). Estima-se que no Brasil, os custos para o Sistema Único de Saúde, com a hospitalização de pacientes humanos para tratamento de fraturas decorrentes de osteoporose seja de R\$908,18 por paciente (Kowalsky et al., 2001). Nos Estados Unidos da América, somente nos anos 1990, foram registrados 1,3 milhões de fraturas ósseas anuais decorrentes de osteoporose, as quais oneraram o Estado em 3,8 bilhões de dólares em custos de tratamento (Louzada et al., 1998).

O desenvolvimento de modelos animais com osteoporose para validação ou desenvolvimento de métodos diagnósticos ou para estudos pré-clínicos com terapias convencionais e não convencionais constituem relevantes alternativas para tentar reduzir o tempo de internação dos pacientes e custos ao SUS (Castañeda et al., 2006; Costa et al., 2015). A indução de hipercortisolismo mediante administração de corticosteroides, associado à privação estrogênica decorrente de ovariectomia, constituem-se nos principais métodos de indução de osteoporose experimental em coelhos, de metodologia exequível e reprodutível (Baofeng et al., 2010). A perda óssea induzida pelo método é significativa (Oue et al., 2015) e são relatados mínimos efeitos deletérios (Castañeda et al., 2008). O método de privação estrogênica exclusiva decorrente de ovariectomia tem sido mais utilizado em modelos murinos (Luo et al., 2012; Ruosi et al., 2015; Wen et al., 2015). Contudo, os modelos murinos apresentam as desvantagens de limitação em

alcançar a maturidade esquelética e a baixa taxa de remodelação no osso cortical (Baofeng et al., 2010). Por este motivo, ovelhas e coelhos são sugeridos como modelos mais adequados ao estudo de remodelação óssea (Castañeda et al., 2008).

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar a densidade óssea de coelhas com osteoporose, incluindo tomografia computadorizada, absorciometria de raio-x de alta energia e fotometria radiográfica (Amam e Rustom, 2014). Contudo, estas técnicas envolvem procedimentos radiográficos especiais e apresentam custo elevado, limitando sua utilização em medicina veterinária e em modelos animais para pesquisa (Ruosi et al., 2015). A densitometria óptica radiográfica utilizando o penetrômetro, associado à análise da densidade óssea por programas computacionais, é referido como uma ferramenta promissora para avaliação da osteoporose em animais (Amam e Rustom, 2014; Silveira et al., 2008). Segundo Silveira et al. (2008), a técnica permite avaliar a densidade óssea com precisão e sensibilidade. Além disso, constitui-se num método de análise quantitativo, não invasivo, de baixo custo e que não requer intervenção anestésica (Muramoto et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia da avaliação da densidade óssea por meio da densitometria óptica radiográfica em tibia de coelhas, antes e após ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva e indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O desenho experimental ora apresentado foi previamente autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), sob o número 097/14 da Universidade Federal do Piauí (UFPI) (anexo1).

Utilizou-se oito coelhas (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, fêmeas, nulíparas, com um ano de idade e peso médio de $2,1 \pm 0,19$ kg de peso corporal. Foram selecionadas coelhas clinicamente saudáveis (normofagia, normoquezia, mormodipsia e normoúria) e que apresentavam avaliação hematológica e avaliação bioquímica (uréia, creatinina) dentro dos padrões de normalidade para a espécie (Brito et al., 2004).

Os animais foram confinados individualmente em gaiolas de arame galvanizado (60 x 60 x 40 centímetros), alojadas em galpão coberto de 9 x 2 metros de área, protegidas da incidência

solar direta e com ventilação lateral, onde a temperatura foi mantida a 30°C com 40% de umidade relativa e fotoperíodo natural, coincidente com a luminosidade regional (Teresina, Brasil, latitude: 05° 05' 21" S, longitude: 42° 48' 07" W, altitude 72m), no Núcleo de Estudos e Preservação de Animais Silvestres (NEPAS/UFPI). Utilizou-se ração específica para coelhos (180g proteína bruta, 140g matéria fibrosa, 6g de cálcio) como base alimentar associada a feno, leguminosas, tubérculos e água *ad libitum*.

Mensurou-se o peso corporal, ingestão de alimento e nível de consciência de todas as coelhas periodicamente durante todo o período experimental.

Avaliação do cálcio sérico

Depois de um período de quarentena e de aclimação de 10 dias, todos os animais foram mantidos em jejum de seis horas e sedados com associação de quetamina² (50mg/Kg) e midazolam³ (10mg/Kg) por via intramuscular no quadríceps femoral, para coleta de sangue por punção venosa jugular para mensuração sérica de cálcio ionizável e fósforo, realizada no setor de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí.

As mensurações de cálcio e fósforo foram realizadas por espectrofotometria⁴ por método colorimétrico⁵, sendo uma vez, antes da OSH eletiva e indução do hipercortisolismo e uma vez aos 80 e 60 dias após os mesmos, respectivamente.

Densitometria óptica radiográfica

A densidade óssea foi avaliada de forma não invasiva, pelo método quantitativo de densitometria óptica radiográfica com uso de penetrômetro⁶ de alumínio ultra purificado, onze degraus, de densidade mínima de 1,375cm³ e máxima de 2,282cm³, com variação entre degraus de 0,091cm³. Os animais apresentavam-se sedados posteriormente à coleta de sangue venoso e foram posicionados em decúbito lateral para incidência radiográfica médio lateral e em decúbito dorsal para incidência radiográfica crânio-caudal das tíbias, realizadas no setor de Diagnóstico Por Imagem da Universidade Federal do Piauí (Figura 1). Utilizou-se técnica radiográfica simples em

² Quetamina injetável 10g/100mL. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

³ Midazolam injetável 15mg (5mg/mL). Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA. Itapira - São Paulo – Brasil.

⁴ Espectrofotômetro 432. Femto (Ind. Com. De Instrumentos Ltda. São Paulo – SP – Brasil.

⁵ Katal kit. Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. Belo Horizonte – MG – Brasil.

⁶ Modelo 07-456. Supertech® x-ray. 2.50 x 5.50 x 1.375. Cada degrau 0.5 na superfície e 3 mm laterais. Peso 500g. 4505 Wyland Dr Ste 400, Elkhart, Indiana – EUA.

aparelho radiográfico convencional⁷ com distância foco-filme de 100cm, chassis metálicos 24x30cm, com telas intensificadoras⁸ e filmes radiográficos⁹ 24x30cm. O chassi foi acondicionado dentro do porta-chassi, com 3mm de espessura, onde estava fixado o penetrômetro de alumínio, sendo radiografado ao lado direito da tíbia direita. Padronizou-se a kilovoltagem (kVp) de 75kVp, a miliamperagem por segundo (mAs) de 100mAs e tempo de 0,3 segundos, em ambas as projeções.



Figura 1. Posicionamento em decúbito dorsal para incidência radiográfica crânio-caudal das tíbias de uma coelha. Fonte: arquivo pessoal.

⁷ Aparelho de radiografia manual. Ray Tec 300mA, São Paulo, Brasil.

⁸ Kodak Lanex X - Omatic Regular Screens (Kodak Eastman Company). Califórnia – EUA.

⁹ BRAF – Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda. Paulínia – São Paulo – Brasil.

As imagens radiográficas obtidas foram convertidas para imagens digitalizadas com um digitalizador de mesa compacto para radiografia computadorizada¹⁰, preservando-se as dimensões e proporções originais da película radiográfica. Posteriormente, as imagens foram analisadas pelo software Adobe Photoshop CC 64-Bit para avaliação da escala de cinza. Não houve manipulação das saturações de brilho, contraste ou nitidez das imagens, mantendo-se as características fotográficas originais das mesmas, manipuladas com microcomputador portátil¹¹.

Com o auxílio do software Adobe Photoshop CC 64-Bit selecionou-se a região central da diáfise da tíbia direita e aplicou-se a ferramenta “escala de cinza”, na qual é gerado um gráfico da intensidade e variação dos tons de cinza na área demarcada. Em seguida, aplicou-se o mesmo método para cada degrau do penetrômetro, obtendo-se curva equivalente de saturação de escala de cinza. Baseado nas informações técnicas do fabricante do penetrômetro que estabelece, em cm³, a densidade de cada degrau, correlacionou-se as mensurações da região central da diáfise da tíbia direita com a saturação do degrau equivalente do penetrômetro indicada automaticamente pelo software, obtendo-se assim a densidade óssea avaliada.

As avaliações da densidade óptica radiográfica foram repetidas aos 80 dias após realização de OSH eletiva e 60 dias após a indução da hipercortisolismo e osteoporose.

Indução de hipercortisolismo e osteoporose

Todos os animais foram submetidos à ovariosalpingohisterectomia eletiva após o período de aclimação. Para tanto, as coelhas foram submetidas à antibioticoterapia profilática com enrofloxacin¹² (10,0 mg/kg, IM) e analgesia pela administração de tramadol¹³ (2,0 mg/kg, IM), no pré, trans e pós-operatório durante dez e três dias, respectivamente.

Após jejum hídrico de duas horas e alimentar de seis horas, os animais foram submetidos à indução anestésica com a associação entre midazolam³ e quetamina². Após a ocorrência de decúbito dos animais, os mesmos foram entubados¹⁴ e mantidos em anestesia inalatória com isoflurano¹⁵ a 2%.

¹⁰ Scanner CR30-X. Agfa HealthCare. Olímpia - São Paulo – Brasil.

¹¹ Notebook Asus N46V, processador Intel[®] Core™ i7-3610QM CPU 2.30GHz, RAM 8,00 GB, Placa de vídeo nvidia GeForce[®] GT 630M 2GB. São Paulo – São Paulo – Brasil.

¹² Chemitril[®] 10% injetável 10g/100mL. Chemitec Agro-veterinária LTDA. Ipiranga – São Paulo – Brasil.

¹³ Tramadol injetável 50mg/mL. Teuto Brasileiro S.A. Anápolis – Goiás – Brasil.

¹⁴ Sonda endotraqueal número 2. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil.

¹⁵ Forane[®] Isoflurano. Abbott laboratórios do Brasil. São Paulo – São Paulo – Brasil.

Procedeu-se a técnica de ovariosalpingohisterectomia de forma convencional conforme descrito por Bueno et al. (2012).

As coelhas foram assistidas em tempo integral após a recuperação anestésica e ao longo de 15 dias de transcorrido o procedimento cirúrgico. Após 60 dias da realização da OSH eletiva, iniciou-se a indução de hipercortisolismo por meio da administração de succinato de metilprednisolona¹⁶ (1,5mg/Kg/SC) a cada 24 horas ao longo de quatro semanas consecutivas. Concomitantemente, administrou-se omeprazol¹⁷ (0,7mg/kg) por via oral a cada 24 horas por igual período.

Todos os animais foram mantidos em repouso absoluto por quatro semanas após a indução do hipercortisolismo e osteoporose até reavaliação por densitometria óptica radiográfica.

RESULTADOS

Todos os animais exibiram apatia, hiporexia e perda de peso progressiva após a indução do hipercortisolismo e osteoporose (Tabela 1). Para prevenir a possibilidade de óbito, intensificou-se a suplementação alimentar com polivitamínico mineral¹⁸, associado a solução eletrolítica oral¹⁹, a partir dos 70 dias. Ademais, aumentou-se a oferta e variedade de frutas, leguminosas e tubérculos para estimular o apetite dos animais. Após 30 dias de tratamento, identificou-se ganho de peso em todas as coelhas (Tabela 1).

¹⁶ Succinato sódico de metilprednisolona injetável 500mg. Novafarma indústria farmacêutica. Anápolis – Goiás – Brasil.

¹⁷ Petprazol 10mg. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

¹⁸ Glicopan Pet[®]. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

¹⁹ Eletrolitic Pet[®]. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

Tabela 1. Variação do peso (kg) de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas (OSH), ao longo de 80 dias pós OSH e 60 dias após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose

	Inicial	60 dias [*]	70 dias ^{**}	80 dias ^{**†}
Animal 1	2,40	2,00	1,70	1,90
Animal 2	2,20	1,80	1,60	1,90
Animal 3	1,80	1,60	1,40	1,80
Animal 4	2,20	1,90	1,70	2,00
Animal 5	2,10	1,90	1,60	1,90
Animal 6	2,30	2,00	1,80	2,10
Animal 7	2,30	1,90	1,60	1,90
Animal 8	1,90	1,70	1,40	1,80
Média	2,15±0,19	1,85±0,13	1,60±0,13	1,91±0,09

^{*}Pós OSH ^{**}Pós OSH e indução de hipercortisolismo

[†]Período adicional correspondente aos 30 dias de suplementação e intensificação da nutrição.

Observou-se elevação sérica média de 1,68mg/dL de cálcio ionizável e 0,27 mg/dL de fósforo após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose (Tabela 2). Apenas dois animais apresentaram redução dos níveis de cálcio sério ionizável e três, do fósforo sérico após o período de indução experimental.

Apesar de mantidas isoladas em confinamento, duas coelhas exibiram fratura espontânea de tíbia e fíbula, sendo imediatamente submetidas à correção cirúrgica por meio do uso de pino intramedular e cerclagem, adaptado da técnica descrita por Borges et al. (2013) (Figura 2).

Tabela 2. Valores séricos de cálcio ionizável e fósforo de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas, antes e após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose

	Cálcio sério ionizável (mg/dL)		Fósforo sérico (mg/dL)	
	Antes da indução	Após a indução	Antes da indução	Após a indução
Animal 1	12,10	16,20	3,60	6,40
Animal 2	10,90	12,10	5,30	5,40
Animal 3	11,20	13,20	4,90	5,90
Animal 4	12,80	11,90	5,60	4,40
Animal 5	10,50	14,50	3,70	4,60
Animal 6	11,90	14,00	5,00	4,40
Animal 7	12,30	11,40	6,20	4,00
Animal 8	12,30	14,16	4,55	5,92
Média	11,75±0,74	13,43±1,50	4,86±0,89	5,13±0,89

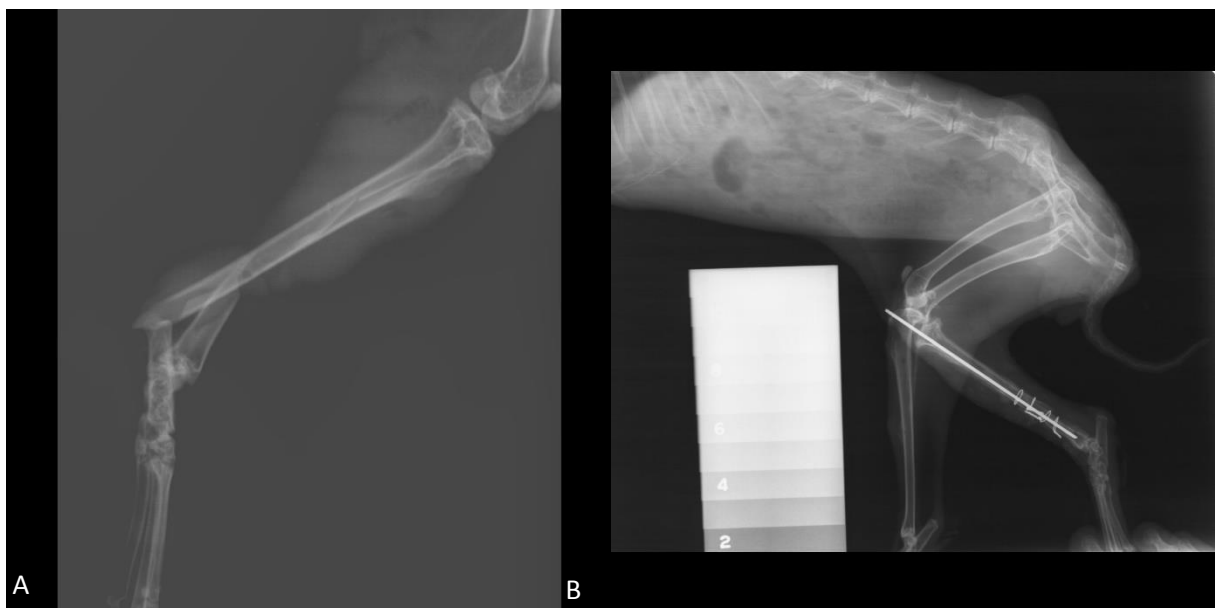


Figura 2. Imagem radiográfica da tíbia esquerda de uma coelha após indução de hipercortisolismo e osteoporose. A: Fratura completa oblíqua no terço distal da tíbia esquerda. B: Mesma fratura após estabilização com pino intramedular e cerclagem.

A densitometria óptica radiográfica das tíbias antes da indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose, identificou valores acima de $1,375 \text{ cm}^3$ e abaixo de $1,647 \text{ cm}^3$. O gráfico em vermelho indica que a densidade mineral óssea da tíbia está localizada entre as densidades dos degraus do penetrômetro. Comparando-se a densidade óssea entre as mesmas coelhas, percebe-se a diminuição da densidade óssea em vermelho a patamares inferiores a $1,375 \text{ cm}^3$ após a indução do modelo (Figura 3) (Tabela 3).

Não foi possível mensurar o valor preciso de decaimento da densidade óssea óptica após indução do modelo, devido a densidade observada ser inferior ao último degrau de menor densidade do penetrômetro, inviabilizando o referencial densitométrico.

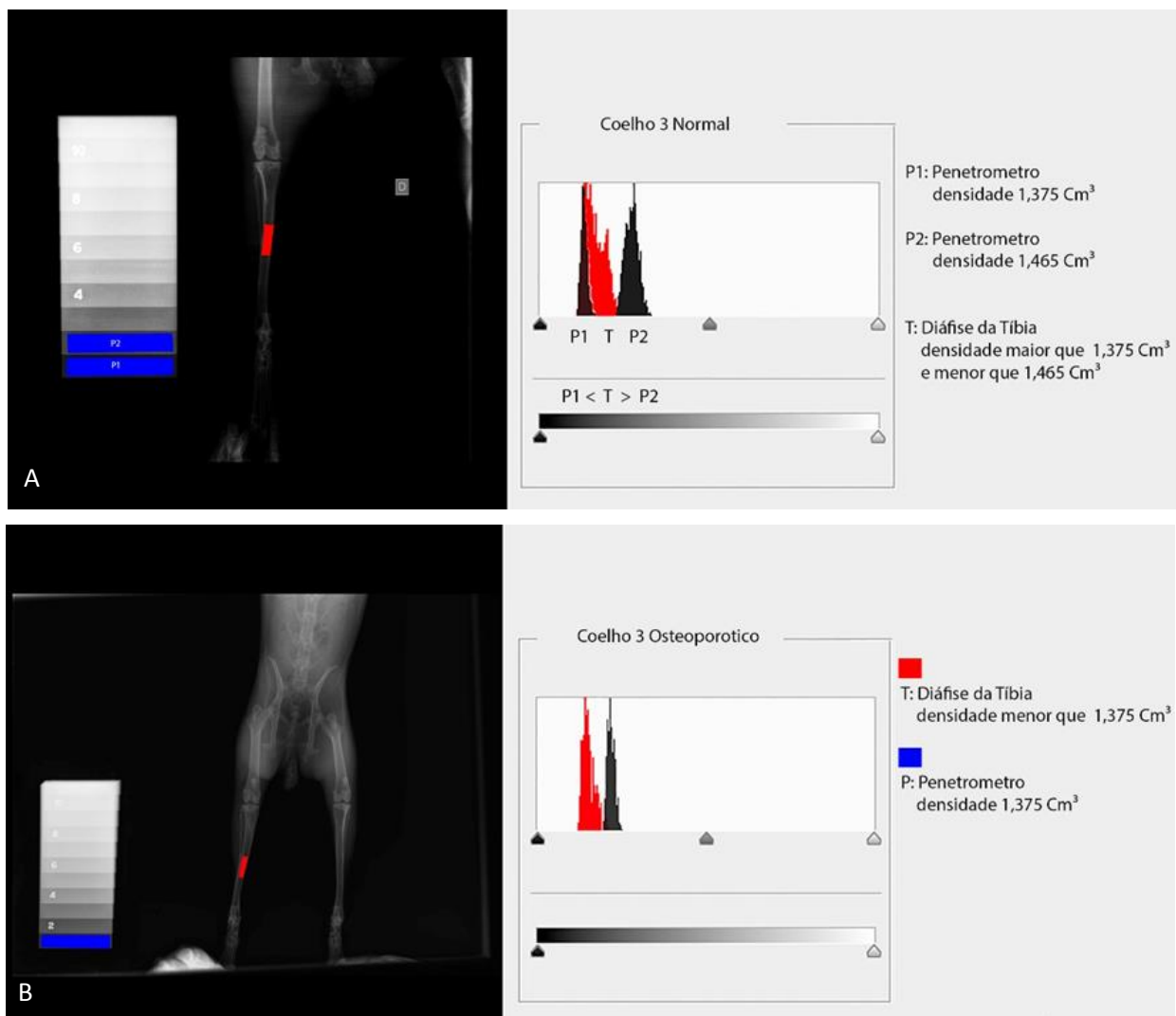


Figura 3. Imagens de densitometria óptica radiográfica da tíbia de uma coelha antes e após a indução de hipercortisolismo e osteoporose. A: Antes da indução do modelo, a densidade óssea é maior que 1,375cm³ e menor que 1,647cm³. B: Após a indução do modelo, a densidade óssea é inferior a 1,375cm³, evidenciando perda da densidade óssea.

Tabela 3. Intervalos de densitometria óptica radiográfica (cm^3) de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas, antes e após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose, utilizando penetrômetro de alumínio de 11 graus

	Antes da indução (cm^3)	Após a indução (cm^3)
Animal 1	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 2	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,46$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 3	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 4	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 5	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,46$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 6	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 7	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 8	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Média	$1,37 < \mathbf{X} \leq 1,52$	$\mathbf{X} < 1,37$

DISCUSSÃO

O modelo animal de osteoporose apresentado neste estudo baseou-se na indução temporária de hipercortisolismo iatrogênico, tal qual descrito anteriormente por Baofeng et al. (2010) e Oue et al. (2015) associado à privação estrogênica permanente cirurgicamente induzida, como referido por Ruosi et al. (2015) e Wen et al. (2015). A associação destas técnicas é descrita como a mais eficaz, por estimular agudamente o aumento da reabsorção osteoclástica, supressão da formação óssea no osso cortical e trabecular, desequilibrando assim a relação entre formação e reabsorção óssea (Kaveh et al., 2010; Oki et al., 2016; Oue et al., 2015). Estudos contemporâneos recomendam a associação destas técnicas em modelos de mamíferos lagomorfos, como os

coelhos, pois estes apresentam precocidade da maturidade esquelética e celeridade do processo de remodelação óssea (Baofeng et al., 2010; Castañeda et al., 2008).

Sendo a premissa do modelo animal proposto, a consequência final do estado clínico de osteoporose, baseado na identificação posterior de alteração radiográfica compatível e fragilidade óssea clinicamente identificável, assumiu-se o silogismo da presunção de hipercortisolismo iatrogênico mediante a adoção da dose de 1,5mg/Kg, superior à recomendação usualmente indicada para a espécie (Baofeng et al., 2010; Castañeda et al., 2006). A utilização de sobredosagem de corticoides para indução de osteoporose já havia sido relatada anteriormente (Castañeda et al. 2008) e por estes motivos considera-se a mensuração de cortisol sérico, avaliação ultrassonográfica das adrenais, bem como testes clínicos adicionais para identificar a supressão mineralocorticoide, desnecessária para o presente estudo.

Não obstante, os sinais clínicos observados nos animais deste experimento, como hiporexia e perda de peso, não são compatíveis com as manifestações clínicas típicas de hiperadrenocorticismos/síndrome de Cushing descritas em outras espécies (Ferreira Filho et al., 2013; Hayashi et al., 2011; Rollin e Czepielewski, 2003). Segundo estes autores, a polifagia, ganho de peso, distensão abdominal e dermatopatias são os sinais clínicos mais comumente observados, sinais estes discrepantes aos observados no presente estudo. Contudo, Baofeng et al. (2010), Castañeda et al. (2006), e Lin et al. (2016) identificaram perda de peso significativa em coelhos submetidos à corticoideterapia, mas também não realizaram investigação para diagnóstico de hiperadrenocorticismos. Pressupõe-se que o hipercortisolismo induzido neste modelo talvez não represente um hiperadrenocorticismos verdadeiro e permanente, mas tão somente um estado transitório ou ainda que a manifestação clínica do hiperadrenocorticismos iatrogênico em coelhos seja incomum, quando comparada com outras espécies. Faz-se mister, portanto, estudos adicionais para elucidar precisamente a apresentação clínica do hiperadrenocorticismos em lagomorfos.

Ainda que transitório, o hipercortisolismo iatrogênico induziu alterações relevantes nas concentrações de cálcio ionizável e fósforo séricos (Tabela 2), bem como na densidade óssea (Figura 3). A elevação média observada nas concentrações de cálcio e fósforo já haviam sido descritas por Lanna et al. (2003). Segundo estes autores, a administração crônica de corticoide, ainda que em posologias terapêuticas, bem como a sobredosagem em humanos e animais, pode induzir hiperparatireoidismo secundário iatrogênico secundária à hiperplasia de paratireoides.

Segundo descrito por Romanholi e Salgado (2007), o paratormônio (PTH) age diretamente sobre os rins e tecido ósseo, estimulando a reabsorção de cálcio e liberação dos íons cálcio e fósforo para o meio extracelular, respectivamente, e indiretamente sobre os intestinos, induzindo o incremento dos níveis séricos de cálcio. Desta forma, a elevação média identificada nos níveis séricos destes íons nos animais deste estudo, pode refletir maior atividade do PTH induzida por corticoide, corroborando para a presunção de sucesso no modelo proposto.

De forma análoga, sustenta esta hipótese, a observação de fraturas espontâneas em duas coelhas do presente estudo (Figura 2). Tal condição já havia sido descrita por Lanna et al. (2003) como condição inequívoca da desmineralização óssea grave em seres humanos. Segundo estes autores, 30 a 35% dos pacientes humanos portadores de hipercortisolismo apresentam algum tipo de fratura. Anteriormente, Van Staa et al. (2000) já haviam descrito que há uma correlação diretamente proporcional entre dose de corticoide e risco de fraturas, persistindo a última ainda que sob posologias terapêuticas. Neste estudo, ainda que os animais fossem mantidos sob confinamento, observou-se a ocorrência de fraturas espontâneas, corroborando as observações de Lanna et al. (2003). As fraturas observadas nas duas coelhas foram tratadas cirurgicamente, conforme recomendado por Borges et al. (2013). Contudo obrigou-se à adaptação da técnica, visto que a manipulação cirúrgica da tíbia afetada suscitava o risco de nova fratura, fato que justifica a não correção da migração do pino intramedular, observado na figura 2. Apesar desta, as duas coelhas recuperaram-se integralmente das fraturas sofridas.

Os dados de densitometria óssea óptica radiográfica obtidos neste estudo (Figura 3) demonstram redução acentuada da densidade óssea da tíbia de todas as coelhas. Esta técnica já havia sido bem descrita em coelhos (Louzada, 2002), ratos (Silva et al., 2007), gatos (Rahal et al., 2002), equinos (Godoy et al., 2005) e seres humanos (Canali et al., 2011), dentre outras espécies. Para minimizar a possibilidade de erros de padronização radiográfica, utilizou-se um penetrômetro de alumínio ultra purificado de 11 de graus como referencial densitométrico, conforme proposto por Louzada (2002). Segundo este autor, esta técnica apresenta elevada sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, fidelidade, fácil exequibilidade e baixo custo e sendo amplamente descrita por outros pesquisadores, sobretudo aplicada a coelhas portadores de osteoporose induzida (Costa et al., 2015), fato que justifica sua adoção na metodologia ora apresentada neste estudo.

Parece-nos salutar e evidente que a redução da densidade óssea identificada pela técnica de densitometria óptica radiográfica está diretamente relacionada à elevação média sérica dos níveis de cálcio ionizável e fósforo. A conjectura da observação de fraturas espontâneas associada a hipercalcemia e hiperfosfatemia transitória, permite-nos inferir verídicas as observações pregressas de Lanna et al. (2003) que a perda de massa mineral óssea pode ser decorrente da ação de glicocorticoides, os quais tanto podem induzir hiperplasia paratireoideana e elevação da síntese de PTH, quanto produzir estimulação de osteoclastos, intensificando-se a reabsorção óssea.

Neste estudo, todas as coelhas induzidas à hipercortisolismo e osteoporose apresentaram densidades ósseas médias inferiores a $1,37 \text{ cm}^3$, tendo o último degrau de menor densidade do penetrômetro como referencial densitométrico. Nesse aspecto, identifica-se limitação do método proposto quando se utiliza um penetrômetro de apenas 11 degraus, por não ser possível precisar com exatidão os valores abaixo desse patamar. Possivelmente, a adoção de um penetrômetro com 21 degraus ou mais permitir-nos-ia uma avaliação de maior acurácia. Contudo, este fato não oblitera a observação de que a associação entre ovariosalpingohisterectomia e administração de corticoide induz redução acentuada da densidade óssea.

Neste estudo optou-se pela adoção de ferramenta de análise de imagem digital em detrimento da utilização de densitômetro para leitura da densidade óptica, conforme descrito por Louzada et al. (1998). Segundo estes autores a densidade óssea é interpretada por meio da leitura do densitômetro seguida da posterior obtenção da relação entre os valores da densidade óptica e de espessura do penetrômetro e do objeto radiografado simultaneamente, por meio do método matemático dos mínimos quadrados. Esta técnica foi descrita inicialmente por Pelá et al. (1992) e reproduzida com sucesso em experimentos posteriores (Louzada et al., 2001; Muramoto et al., 2005; Vulcano et al., 2008). Apesar da eficácia e sensibilidade do método descrito por Pelá et al. (1992), optou-se pela adoção da ferramenta digital de análise de imagem software Adobe Photoshop CC 64-Bit, baseado no estudo realizado por Silva e Tavano (1999) que utilizaram a versão anterior Adobe Photoshop 4.0 para comparação das densidades ópticas e radiográficas. Contudo estes autores também utilizaram densitômetro para leitura das densidades ópticas.

A utilização exclusiva de softwares de análise de imagens já havia sido descrita por Lisane et al. (2007) e Takeshita et al. (2013) os quais também utilizaram versão anterior software Adobe Photoshop 6.0, utilizando escala de pixels associada a escala de cinza para produção do

histograma de variação de cinza para fins de comparação da densidade óptica com a densidade do penetrômetro. Este trabalho apresenta uma metodologia inédita e alternativa às técnicas anteriormente descritas, pois utiliza exclusivamente a ferramenta de escala de cinza do software Adobe Photoshop CC 64-Bit para comparar o gráfico de histograma obtido com a leitura de escala de cinza de cada degrau do penetrômetro. Como o fabricante dispõe do valor da densidade de cada degrau em cm^3 é possível aferir com precisão a densidade da região óssea avaliada. Denotando esta adaptação de método, ressalta-se que a literatura científica abordando densitometria óptica radiográfica consultada fornece valores de densidade em espessura relativa (milímetros de alumínio – mmAl), enquanto que os dados obtidos no presente estudo representam valores específicos em cm^3 . Pressupõe-se inicialmente que estas medidas em unidade de cm^3 podem fornecer uma informação mais precisa, do ponto de vista clínico, sobre a densidade óssea avaliada. Contudo, como os métodos quantitativos de densitometria óptica não foram comparados entre si suscita-se a necessidade de novos estudos para elucidar estas relevantes questões.

CONCLUSÃO

A privação estrogênica permanente cirurgicamente induzida por ovariectomia associada a indução temporária de hipercortisolismo iatrogênico em coelhas nulíparas adultas foi eficaz em induzir osteoporose secundária grave.

O modelo de osteoporose proposto caracterizou-se por hipercalcemia e hiperfosfatemia transitórias, associados à perda de peso progressiva e desenvolvimento de fraturas expostas em confinamento, sob mínima atividade física.

A densitometria óptica radiográfica utilizando-se um penetrômetro de alumínio como referencial densitométrico constituiu-se em técnica sensível, eficaz e de fácil exequibilidade para identificação de redução da densidade óssea em tíbias de coelhas portadoras de osteoporose secundária.

A utilização da ferramenta ‘escala de cinza’ do software Adobe Photoshop CC 64-Bit foi eficaz para produzir um histograma de comparação entre as densidades ópticas dos degraus do penetrômetro e da área da tíbia analisada, permitindo aferir com precisão a densidade óssea em cm^3 .

REFERÊNCIAS

- Amam, A., & Rustom, J. (2014). Assessment of mandibular alveolar bone density in osteoporotic adults in Syria. *J. Dent and Oral Medicine*, 2, 26-32.
- Baofeng, L., Zhi, Y., Bei, C., Guolin, M., Qingshui, Y., Jian, L. (2010). Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthop.*, 3, 396–401.
- Borges, N. F., Rezende, C. M. F., Serakides, R., Santos, R. G., Torres, R. C. S. (2013). Avaliação clínica, radiográfica e histológica da placa em ponte associada ao pino intramedular e da placa de compressão dinâmica em osteossíntese de fêmur de coelhos. *Arch. Vet. Scienc.*, 18, 33-42.
- Bracco, O. L., Fortes, E. M., Raffaelli, M. P., Araújo, D.V., Santili, C., Castro, M.L. (2009). Custo hospitalar para tratamento da fratura aguda do fêmur por osteoporose em dois hospitais-escola conveniados ao Sistema Único de Saúde. *J. Bras. Econ. Saúde*, 1, 3-10.
- Bueno, C. M., Cerejo, S. A., Miguel, M. P., Franco, L. G., Honsho, C. S. (2012). Utilização do 2-octil-cianoacrilato na ovariectomia de coelhas, comparativamente ao fio de náilon: análise de tempo e alterações macroscópicas. *E. Biosfera*, 8, 1657- 1671.
- Calkins, E., Kahn, D., Diner, W. C. (1956). Idiopathic familial osteoporosis in dogs: “Osteogenesis imperfecta”. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 64, 410–423.
- Canali, G. D., Takahashi, C. M., Mello, A. S., Costa, M. B., Souza, P. H. C., Tolazzi, A. L., Westphalen, V. P. D., Westphalen, F. H. (2011). Estudo comparativo da densidade óptica óssea obtida em radiografias panorâmicas e da densitometria óssea em mulheres histerectomizadas e não histerectomizadas. *Rev. Fac. Odontol. UPF*, 16, 149-153.
- Castañeda, S., Calvo, E., Largo, R., González-González, R., de la Piedra, C., Díaz-Curiel, M., Herrero-Beaumont, G. (2008). Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J. Bone Miner. Metab.*, 26:53–59.
- Castañeda, S., Largo, R., Calvo, E., Rodríguez-Salvanés, F., Marcos, M. E., Díaz-Curiel, M., Herrero-Beaumont, G. (2006). Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.*, 35: 34–41.
- Costa, P. H. C., Widmer, A. D. S. A., Valente, F. L., Sepúlveda, R.V., Perdigão, A. P. L., Borges, A. P. B. (2015, November). Avaliação radiográfica de um modelo experimental para indução da osteoporose em coelhos. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Curitiba, PR.

- Elkaragy, A., & Omram, M. (2013). The efficacy of using systemic alendronate in combination with platelet-rich plasma in the osteotomy implant site of osteoporotic rabbits. *J. Am. Sci. American Science*, 12, 353-363.
- Ferreira Filho, D. F., Fiuza, R. F., Leite, A. K. R. M. (2013). Síndrome de cushing iatrogênica em cão: relato de caso. *Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.*, 21, 1-7.
- Godoy, C. L. B., Vulcano, L. C., Santos, F. A. M., Soares, J. C. M. (2005). Valores normais da densidade mineral óssea do acessório do carpo em equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH) determinados por meio da densitometria óptica em imagem radiográfica. *Cienc. Rural*, 35, 607-610.
- Hayashi, L. F., Noguti, K. O., Nakamura, O. H., Kater, C. E., Vieira, J. G. H. (2011). Desenvolvimento de um radioimunoensaio de dexametasona no soro como subsídio para o diagnóstico da síndrome de Cushing. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 47, 505-510.
- Jee, W.S.S, & Yao, W. (2010). Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 3, 193-207.
- Jing, D., Hao, X., Xu, F., Liu, J., Xu, F., Luo, E., Meng, G. (2016). Effects of local delivery of BMP2, zoledronate and their combination on bone microarchitecture, biomechanics and bone turnover in osteoporotic rabbits. *Sci Rep.*, 22, 1-10.
- Kaveh, K., Ibrahim, R., AbuBakar, Z.M., Ibrahim, A.T. (2010). Osteoporosis induction in animal model. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, 2, 139-145.
- Kowalski, S.C., Sjenzfeld, V. L., Ferraz, M.B. (2001). Utilização de recursos e custos em osteoporose. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 47, 352-357.
- Lanna, C. M. M., Montenegro Jr., R. M., Paula, F. J. A. (2003). Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticoide. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 47, 9-18.
- Li, F., Zhou, C., Xu, L., Tao, S., Zhao, J., Gu, Q. (2016). Effect of stem cell therapy on bone mineral density: A meta-analysis of preclinical studies in animal models of osteoporosis. *PLoS ONE*, 11, 1-13.
- Lin, T., Liu, J., Yang, S., Liu, X., Feng, X., Fu, D. (2016). Relation between the development of osteoporosis and osteonecrosis following glucocorticoid in a rabbit model. *Indian J. Orthop.*, 50, 406-413.
- Lisane, H., Winck, M. C. R., Mota, F. M. P., Alexandre, C., Bauer, V. E., Vania, F. (2007). Comparação de três sistemas digitais em relação à densidade óptica de cimentos de ionômero de vidro. *Rev. Odonto Ciênc.*, 22, 233-237.

- Louzada, M. J. Q. (2002). Densitometria óptica radiográfica na mensuração da densidade mineral óssea de coelhos em crescimento. *Ars Vet.*, 18, 107-110.
- Louzada, M. J. Q., Nogueira, G. P., Junior, I. R. G., Carvalho, C. A., Paula, G. A. (2001). Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. *Rev. Fac. Odontol. Lins*, 13, 33-38.
- Louzada, M. J. Q., Pelá, C. A., Belangero, W. D., Santos-Pinto, R. (1998). Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. *Cad. Eng. Biomed.*, 14, 37-47.
- Luo, E., Hu, J., Bao, C., Li, Y., Tu, Q., Murray, D., Chen, J. (2012). Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. *Acta Biomater.*, 2,734-743.
- Luo, K., Ma, S., Guo, J., Huang, J., Yan, F., Xiao Y. (2014). Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *BioMed Res. Int.*, 1, 1-7.
- Muramoto, C., Sterman, F. A., Fonseca Pinto, A.C.B.C. (2005). Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça poodle por meio da densitometria óptica radiográfica. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 42, 89-97.
- Oki, Y., Doi, K., Makihara, Y., Kubo, T., Oue, H., Tsuga, K. (2016). Intermittent administration of parathyroid hormone enhances primary stability of dental implants in a bone-reduced rabbit model. *J Oral Sci*, 58, 241-246.
- Oue, H., Doi, K., Oki, Y., Makihara, Y., Kubo, T., Perrotti, V., Piattelli, A., Akagawa, Y., Tsuga, K. (2015). Influence of implant surface topography on primary stability in a standardized osteoporosis rabbit model study. *J Funct Biomater*, 6, 143-152.
- Pelá, C. A., Ghilardi Netto, T., Louzada, M. J. Q. (1992, November). Avaliações densitométricas com filmes radiográficos, utilizando uma escada de alumínio como referência". Trabalho apresentado no I Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde, Caxambu, MG.
- Pereira, W. L. A. & Cardoso, E. C. (2010). Osteoporose em bubalinos em relação à idade, à condição clínica animal e ao estado físico-químico ósseo e do cobre hepático. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 47, 159-167.
- Rahal, S. C., Mortari, A. C., Caporali, E. H. G., Vulcano, L. C., Santos, F. A. M., Takahira, R. K., Crocci, A. J. (2002). Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. *Cienc. Rural*, 32, 421-425.
- Rollin, G. A. F. S., & Czepielewski, M. A. (2003). Síndrome de cushing: é possível simplificar e padronizar sua abordagem diagnóstica?. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 47, 368-380.

- Romanholi, D. J. P. C., & Salgado, L. R. (2007). Síndrome de cushing exógena e retirada de glicocorticoides. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51, 1280-1292.
- Rosa, F. B., Galiza, G. J. N., Lucena, R. B., Silva, T. M., Caprioli, R. A., Barros, C. S. L., Figuera, R. A., Kommers, G. D. (2013). Osteoporose em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, 33, 483-489.
- Ruosi, C., Querques, F., Granata, F., Colella, G., Liccardo, F., Lombardo, B., Pastore, L. (2015). Cellular and animal models for the identification of osteoporosis determinants increasing vertebral compression fractures risk. *Osteopor. Phys Act.*, 3, 2-9.
- Silva, A. R. S., Ribeiro, A. C. P., Salzedas, L. M. P., Soubhia, A. M. P., Sundefeld, M. L. M. M. (2007). Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. *Rev. Odonto Ciênc.*, 22, 77-81.
- Silva, P. G., & Tavano, O. (1999). Comparison of the optical and radiographic densities analyzed by photodensitometer m.r.a. and program adobe photoshop 4.0 of the kodak tms-1 films processed in the kodak rp x-omat solution.
- Silveira, D. S., Pippi, N. L., Costa, F. S., Vescovi, L. A., Conti, L. M. C., Weiss, A., Silva, G. F., Júnior, R. R. A., Braga, F. V. A., Vulcano, L. C., Favarato, E., & Júnior, J. C. (2008). O ultrassom terapêutico de 1 MHz, na dose de 0,5 W cm⁻², sobre o tecido ósseo de cães avaliado por densitometria óptica em imagens radiográficas. *Cienc. Rural*, 38, 2225-2231.
- Takehita, W. M., Iwaki, L. C. V., Ivaki Filho, L., Silva, M. C., Silva, P. V. R. (2013). Comparação de diferentes métodos de registro (a priori e a posteriori) na subtração radiográfica digital (SRD) para avaliação da produção de ruídos estruturais. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 13, 197-203.
- Van Staa T. P., Leufkens H. G., Abenhaim L., Zhang B., Cooper C. (2000) Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatol.*, 39, 1383-1389.
- Villa de Brito, M. T., Marques, M. C., Duarte Correia, J. H., Silva-Carvalho, L. (2004). Caracterização de um modelo experimental de hipertensão portal. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, 99, 199-205.
- Vulcano, L. C., Santos, F. A. M., Godoy, C. L. B. (2008). Determinação da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio-ulna em gatos: correlação entre peso, sexo e idade. *Cienc. Rural*, 38, 124-128.
- Wen, X., Xu, C., Wang, F., Feng, Y., Zhao, X., Yan, Y., Lei, W. (2015). Temporal changes of microarchitectural and mechanical parameters of cancellous bone in the osteoporotic rabbit. *BioMed Res Int*, 1, 11.

CAPITULO 2

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
HETERÓLOGAS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS XENOGÊNICO, ASSOCIADAS OU
NÃO, NA REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS EM COELHAS COM OSTEOPOROSE
SECUNDÁRIA**

A ser submetido ao periódico *Acta Cirúrgica Brasileira*

ISSN: 1678-2674

Qualis B1

Avaliação do tratamento com células-tronco mesenquimais heterólogas e plasma rico em plaquetas xenogênico, associadas ou não, na reparação de falhas ósseas em coelhas com osteoporose secundária

Mariá Andrade de Carvalho Rocha^I; Napoleão Martins Argôlo Neto^{II}

I Médica Veterinária, mestranda, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI, Brasil. Radiografia e pós-operatório.

II Médico Veterinário, Professor Adjunto, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI, Brasil. Delineamento experimental e orientação.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a eficácia das células-tronco mesenquimais medulares heterólogas e plasma rico em plaquetas xenogênico, no tratamento de falhas ósseas em tíbia de coelhas portadoras de osteoporose secundária à privação estrogênica e hipercortisolismo iatrogênico.

MÉTODOS: Oito coelhas foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia e corticoideterapia para indução de estado clínico de osteoporose. Produziu-se quatro falhas nas tíbias das coelhas, sendo cada falha tratada com esponja hemostática de colágeno, células-tronco mesenquimais medulares heterólogas de coelhas saudáveis, plasma rico em plaquetas xenogênico obtido de equino saudável e pela associação entre células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, respectivamente. Os animais foram divididos em dois grupos, avaliados radiográfica e histopatologicamente aos 30 e 60 dias pós tratamento.

RESULTADOS: Identificou-se radiograficamente consolidação da falha óssea tratada com células-tronco mesenquimais heterólogas, associada a imagem histológica de tecido ósseo maduro e imaturo, sem evidências de osteopenia, comparado aos demais grupos, nos quais estavam ainda presentes falhas ósseas com respectiva osteopenia e fibrose, denotando efeito satisfatório do primeiro em detrimento aos demais.

CONCLUSÃO: O tratamento com células-tronco mesenquimais medulares heterólogas em falhas ósseas de coelhas com osteoporose secundária induziu consolidação óssea com produção de tecido ósseo maduro e imaturo, quando comparado aos demais tratamentos.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas, osteoporose

Introdução

A osteoporose é uma doença óssea sistêmica caracterizada por redução acentuada da massa mineral, induzindo à diminuição da resistência mecânica e elevando o risco de fraturas¹. Diversos mecanismos são reconhecidos como fatores predisponentes e perpetuantes da osteopenia induzida pela osteoporose, inclusos fatores endócrinos e farmacológicos².

O hipercortisolismo crônico primário ou iatrogênico é a causa mais frequente de osteoporose secundária, correspondendo a 25% de todas as causas de osteoporose em seres Humanos³. Segundo estes autores, glicocorticóides podem induzir hiperplasia de paratireoide, com subsequente aumento sérico dos níveis de paratormônio (PTH), estimulando a reabsorção de cálcio e liberação dos íons cálcio e fósforo para o meio extracelular⁴.

Contrariamente, o estrógeno e seus análogos, possuem efeito profilático sobre a reabsorção óssea, atuando como modulador da remodelação deste tecido^{2,5}. Tal efeito decorre do controle autócrino e parácrino sobre a expressão de fatores de crescimento e citocinas que influenciam o comportamento de osteoblastos e osteoclastos, contribuindo para a manutenção do equilíbrio funcional ósseo⁵.

Segundo Amadei *et al.*⁵, no Brasil, a cada ano, 70 mil pessoas sofrem fraturas decorrentes de osteoporose, com índice de mortalidade de 20% e 50% de invalidez física. Os custos para o Sistema Único de Saúde com a hospitalização destes pacientes foram estimados em aproximadamente R\$908,18 *per capita*⁶.

Atualmente, os bifosfonatos são as drogas mais eficientes para o tratamento da osteoporose humana. Contudo, efeitos adversos como intolerância gastrointestinal⁷, erosões esofágicas, febre, fibrilação atrial, esclerite e osteonecrose mandibular⁸ tem sido descritos, limitando sua utilização⁹.

O uso de células-tronco mesenquimais (CTM) para tratamento de fraturas ósseas vêm se destacando como uma proposta inovadora, devido a elevada plasticidade destas células e o sucesso em induzi-las à diferenciação *in vitro* em osteoblastos^{10,11}. Estudos *in vivo* anteriores já demonstraram a eficácia das CTM na consolidação de fraturas em pacientes saudáveis ou não^{12,13}.

Além desta alternativa, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido utilizado em diversos estudos com pacientes humanos e animais para estimular a cicatrização óssea^{14,15}.

O PRP é uma fonte de plaquetas obtido pela centrifugação de sangue fresco, rico em fatores de crescimento que estimulam a mitogênese, angiogênese e maior atividade das células osteocompetentes, determinando rapidez na formação e homogeneidade óssea¹⁶.

Contudo, segundo Amadei *et al.*⁵ a experiência clínica em relação à reparação óssea na osteoporose é inconsistente, dado os poucos estudos realizados sobre a temática.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos tratamentos com esponja hemostática de colágeno hidrolisado, CTM heterólogas de medula óssea de coelhos, plasma rico em plaquetas xenogênico equino e da associação entre ambos, na reparação de falhas ósseas em tíbias de coelhas portadoras de osteoporose secundária à privação estrogênica e hipercortisolismo iatrogênico.

Métodos

Animais

O desenho experimental ora apresentado foi previamente autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), sob o número 097/14 da Universidade Federal do Piauí (UFPI) (anexo1).

Utilizou-se oito coelhas (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, fêmeas, nulíparas, com um ano de idade e peso médio de $2,1 \pm 0,19$ kg de peso corporal. Foram selecionadas coelhas clinicamente saudáveis (normofagia, normoquezia, normodipsia e normoúria) e que apresentavam avaliação hematológica e avaliação bioquímica (uréia, creatinina) dentro dos padrões de normalidade para a espécie¹⁷.

Os animais foram confinados individualmente em gaiolas de arame galvanizado (60 x 60 x 40 centímetros), alojadas em galpão coberto de 9 x 2 metros de área, protegidas da incidência solar direta e com ventilação lateral, onde a temperatura foi mantida a 30°C com 40% de humidade relativa e fotoperíodo natural, coincidente com a luminosidade regional (Teresina, Brasil, latitude: 05° 05' 21" S, longitude: 42° 48' 07" W, altitude 72m), no Núcleo de Estudos e Preservação de Animais Silvestres (NEPAS/UFPI). Utilizou-se ração específica para coelhos (180g proteína bruta, 140g matéria fibrosa, 6g de cálcio) como base alimentar associada a feno, leguminosas, tubérculos e água *ad libitum*.

Indução da osteoporose

Todos os animais foram submetidos à ovariosalpingohisterectomia eletiva após o período de aclimação, conforme descrito por Bueno *et al.*¹⁸. Após 60 dias da realização da OSH eletiva, iniciou-se a indução de hipercortisolismo por meio da administração de succinato de metilprednisolona, conforme descrito por Rocha *et al.*¹⁹.

Avaliação densitométrica óptica radiográfica

Todos os animais foram submetidos à exame densitométrico óptico radiográfico utilizando um penetrômetro de alumínio de 11 graus, de densidade mínima de $1,375\text{cm}^3$ e

máxima de 2,282cm³, com variação entre degraus de 0,091cm³ como referencial densitométrico. As imagens obtidas foram analisadas pelo software Adobe Photoshop CC 64-Bit para avaliação da densidade óssea, antes e após indução da osteoporose conforme descrito por Rocha *et al.*¹⁹.

Obtenção de células-tronco mesenquimais heterólogas

As CTM foram doadas pelo Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt/UFPI). As células foram isoladas da medula óssea de coelhas saudáveis, expandidas *in vitro*, submetidas a ensaio de diferenciação celular osteogênica e condrogênica e aliqüotadas na concentração de 1x10⁶ células/mL para uso imediato, conforme metodologias descritas previamente por Argolo Neto *et al.*¹⁰, Carvalho *et al.*¹¹ e Argolo Neto *et al.*²⁰.

Avaliação microscópica da interação entre células-tronco mesenquimais e esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado

Três alíquotas de 1x10⁴ CTM/mL foram mantidas em meio DMEM F12 completo[†], juntamente com uma amostra de aproximadamente 3mm de uma esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado^u, em placa de cultivo seis poços^v, incubadas^w à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade²⁰.

Após obtenção de confluência de 80%, o meio de cultivo foi descartado, o poço lavado com solução fosfato tamponante^x e o fragmento de esponja hemostática cuidadosamente retirado com o auxílio de uma agulha de insulina estéril. As CTM foram tripsinizadas e avaliadas quanto à viabilidade celular conforme descrito por Argolo Neto *et al.*¹⁰.

Os fragmentos da esponja hemostática foram então fixadas isoladamente em formol 5%^y por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool^z (30%, 55%, 70%, 88%, 96%), diafanizadas em xilol^{aa}, incluídas em parafina histológica^{bb} e seccionadas em micrótomo rotativo^{cc}, ajustado para 4µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina de vidro, corados

[†] Invitrogen Corporation[®] N° 10565-018, contendo 3,7 g/l de bicarbonato de sódio e 10-15 mM HEPES (Invitrogen Corporation[®] N° 15630080) pH 7,5, suplementado com 15% de soro fetal bovino, 3% de solução de penicilina-estreptomicina (Gibco[®], penicillin-Streptomycin N° 15140-122, 100mL), 1% de L-glutamina 200mM (Invitrogen Corporation[®] N° 25030081, 100mL) e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma[®] N° M7145).

^u Hemospon[®]. Technew comércio e indústria LTDA. Quintino – Rio de Janeiro – Brasil.

^v Placa de seis poços TPP[®], Switzerland

^w Estufa incubadora Series II 3110 water-jacket CO₂ incubator. Thermofisher[®], USA

^x Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4 Osmolality 280 - 315 mOsm/kg, GIBCO[®], N° 10010023, USA.

^y Formol 5%. Indalabor Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA. Dores de Indaiá – Minas Gerais – Brasil.

^z Álcool etílico. Indalabor Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA. Dores de Indaiá – Minas Gerais – Brasil.

^{aa} Xilol. Quimesp Química. Guarulhos – São Paulo – Brasil.

^{bb} Parafina histológica (56-58C). Única Científica. São Caetano do Sul – São Paulo – Brasil.

^{cc} Micrótomo rotativo automáticoRM2255. Leica Biosystems[®]. São Paulo – São Paulo – Brasil.

la Hematoxilina & Eosina e analisados em microscópio óptico binocular^{dd} em objetivas de 10x e 40x.

Obtenção do plasma rico em plaquetas xenogênico

O plasma rico em plaquetas foi adquirido utilizando-se sangue de um equino clinicamente saudável, desvermifugado, com valores hematimétricos dentro do padrão de normalidade determinado para a espécie²¹ e contagem total de plaquetas igual ou superior a $200 \times 10^3/\text{mm}^3$, por meio da cateterização asséptica da veia jugular com cateter 20G. O sangue foi imediatamente processado conforme metodologia descrita por Del Carlo *et al.*¹⁴ e Argolo Neto *et al.*²⁰. O PRP foi preparado imediatamente antes da aplicação.

Delineamento experimental

Adotou-se um delineamento experimental com períodos de observação de 30 e 60 dias pós cirúrgicos e formação de quatro grupos experimentais (CTM, PRP, associação entre CTM e PRP - ASSO e controle - CTR). Todos os grupos coexistiram em cada animal, totalizando oito animais submetidos aos tratamentos. Foram então produzidas quatro falhas ósseas na diáfise da tíbia em terço mais proximal às epífises, em todos os animais. Padronizou-se os tratamentos para a mesma localização em todos os animais: CTM em falha óssea superior da tíbia do membro pélvico direito (MPD), PRP em falha óssea inferior da tíbia do MPD, ASSO em falha superior da tíbia do membro pélvico esquerdo (MPE) e CTR em falha inferior da tíbia do membro pélvico esquerdo (MPE) (Figura 1).

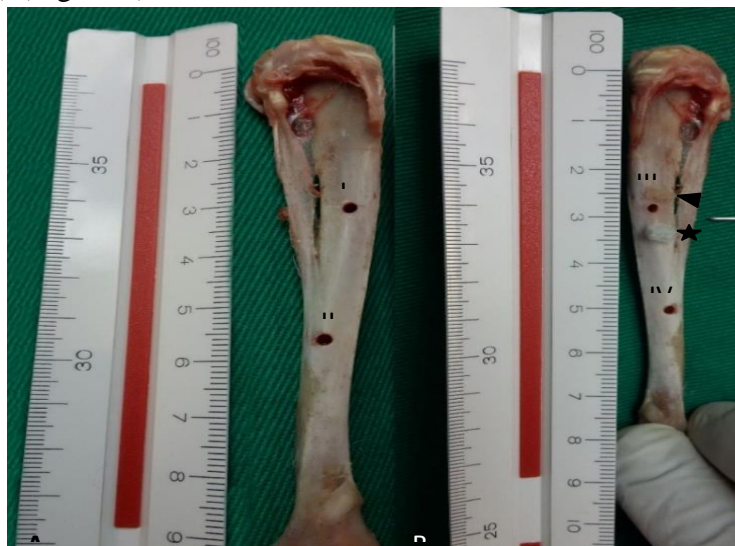


Figura 1. Tíbias de uma coelha adulta saudável com falhas ósseas correspondentes aos tratamentos adotados. A: Tíbia direita. (I) CTM. (II) PRP. B: Tíbia esquerda. (III) ASSO. (IV) CTR. () esponja hemostática umedecida e () seca.

^{dd} Microscópio óptico Olympus AX-70. Olympus Optical do Brasil LTDA. São Paulo – São Paulo – Brasil.

Produção das falhas ósseas

Todos os animais foram submetidos à antibioticoterapia profilática com enrofloxacin^{ee} (10,0 mg/kg, IM) e analgesia pela administração de morfina^{ff} (5,0 mg/kg, IM), no pré, trans e pós-operatório durante dez e três dias, respectivamente. Após jejum hídrico de 2 horas e alimentar de 6 horas, os animais foram sedados com associação de quetamina^{gg} (50mg/Kg) e midazolam^{hh} (10mg/Kg) por via intramuscular no quadríceps femoral. Após a ocorrência de decúbito dos animais, os mesmos foram entubadosⁱⁱ e mantidos em anestesia inalatória com isoflurano^{jj} a 2%.

O campo cirúrgico foi delimitado por campo fenestrado e realizou-se incisão longitudinal da pele, utilizando bisturi^{kk} n.3 com lâmina^{ll} n.15, divulsionando o tecido subcutâneo, fáscia lata e músculo tibial cranial com uma tesoura cirúrgica romba romba^{mmm}, até a exposição óssea. Em seguida, com auxílio de uma furadeira ortopédicaⁿⁿ equipada com broca de aço 2 mm^{oo} e guia de broca¹¹, na velocidade de 5000 rpm, foram realizadas quatro falhas ósseas de 2 mm de diâmetro, sendo duas falhas na região diafisária proximal superior e inferior da tíbia direita e duas falhas na região diafisária proximal superior e inferior da tíbia esquerda, de forma perpendicular à diáfise óssea (Figura 1).

Após a imediata realização dos tratamentos, as fibras divulsionadas do músculo tibial cranial foram fechadas em plano de sutura Sultan interrompido e a pele com sutura simples interrompido, ambas utilizando-se fio monofilamentar de nylon 3-0^{pp}.

Os animais foram mantidos com uso contínuo de colar elisabetano e as feridas cirúrgicas foram limpas diariamente com solução fisiológica estéril e aplicação tópica de pomada à base de alantoína e clorexidine^{qq}.

^{ee} Chemitril® 10% injetável 10g/100mL. Chemitec Agro-veterinária LTDA. Ipiranga – São Paulo – Brasil.

^{ff} Dimorf® 10mg injetável. Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA. Itapira - São Paulo – Brasil.

^{gg} Quetamina injetável 10g/100mL. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

^{hh} Midazolam injetável 15mg (5mg/mL). Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA. Itapira - São Paulo – Brasil.

ⁱⁱ Sonda endotraqueal número 2. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil.

^{jj} Forane® Isoflurano. Abbott laboratórios do Brasil. São Paulo – São Paulo – Brasil.

^{kk} Cabo de bisturi n. 3. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil

^{ll} Lâmina de bisturi n.15. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil

^{mmm} Tesoura cirúrgica de 15cm. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil

ⁿⁿ Furadeira ortopédica autoclavável. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil

^{oo} Broca de aço e guia de broca Vonder®. Grupo OVD. Barbalha – Ceará – Brasil.

^{pp} Fio de sutura mononylon 3-0 ag1,5cm. Ethicon. São Paulo – São Paulo – Brasil.

^{qq} Alantol® pomada. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

Realização dos tratamentos

As falhas periosteais foram tratadas imediatamente, de acordo com o grupo experimental que compunham. Todos os tratamentos foram realizados utilizando fragmentos de aproximadamente 3 mm de esponja hemostática de colágeno hidrolisado estéril (EH), como suporte estrutural (*Scaffold*) para as CTM e/ou PRP, introduzidas nas falhas. O grupo CTM foi tratado com 1×10^6 células sobre EH, o grupo PRP com 1×10^6 plaquetas sobre EH, o grupo ASSO com a associação entre CTM e PRP sobre EH nas mesmas concentrações e CTR apenas com EH embebida em solução fisiológica estéril (Figura 2).

Densitometria óptica radiográfica das falhas ósseas

Após 30 e 60 dias da realização dos tratamentos, as falhas ósseas de todos os animais foram submetidas à exame densitométrico óptico radiográfico conforme descrito anteriormente para avaliação da densidade de preenchimento ósseo nas falhas cirurgicamente induzidas.



Figura 2. Placa de *petri* contendo quatro fragmentos de esponja hemostática de colágeno hidrolisado estéril, embebidas em solução de 1×10^6 CTM, 1×10^6 PRP, solução fisiológica estéril e associação entre CTM e PRP, respectivamente. **MSC = CTM*

Avaliação histopatológica das falhas ósseas tibiais

Após 30 e 60 dias da realização dos tratamentos, os animais foram identificados, pesados, sedados com associação entre midazolam¹⁵ e quetamina¹⁴, e eutanasiados com sobredosagem anestésica de tiopental sódico^{rr} (30mg/mL) administrado por via endovenosa.

Em seguida, realizou-se a amputação cirúrgica das tíbias direita e esquerda de todas as coelhas. Cada tíbia foi identificada, mensurada com escalímetro e fotografada. Cada falha de cada tíbia foi seccionada com auxílio de uma serra elétrica cirúrgica^{ss} mantendo-se dois centímetros de osso acima e abaixo das falhas, identificadas e conservadas individualmente em formol a 10% tamponado^{tt} por 24 horas para posterior processamento histológico.

Após este período, os cortes ósseos contendo as falhas foram submetidas à descalcificação pelo ácido fórmico^{uu}, em solução contendo citrato de sódio^{vv} a 20% e ácido fórmico a 50%, em diluição 1:1 em água destilada. A cada 48 horas a solução foi trocada e a rigidez óssea testada manualmente.

Posteriormente, os fragmentos descalcificados foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool⁸ (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol⁹, incluídas em parafina histológica¹⁰ e seccionadas em micrótomo rotativo¹¹, ajustado para 5µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina de vidro, corados pela Hematoxilina & Eosina e analisados em microscópio óptico binocular^{ww} em objetivas de 10x e 40x.

Análise estatística

Atribuiu-se arbitrariamente valores, em escala de 10, de 10 a 40, correspondente aos intervalos de densidade óptica radiográfica, em cm³, de cada falha óssea avaliada, conforme a tabela 1.

^{rr} Thiopentax[®] 0,5g. Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA. Itapira - São Paulo – Brasil.

^{ss} Serra elétrica cirúrgica. Stryker LTDA. Itaim Bibi – São Paulo - Brasil

^{tt} Formol 10% tamponado (p/v). Indalabor Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA. Dores de Indaiá – Minas Gerais – Brasil.

^{uu} Ácido fórmico 50%. Quimisa. Brusque – Santa Catarina – Brasil.

^{vv} Citrato de sódio. Quimisa. Brusque – Santa Catarina – Brasil.

^{ww} Microscópio binocular invertido NIB100. COLEMAN[®] equipamentos para laboratórios e comércio. Santo André – São Paulo – Brasil.

Tabela 1. Escores arbitrariamente adotados para correspondência aos intervalos mensurados, em cm^3 , da densitometria óptica radiográfica de falhas ósseas tibiais de coelhas, aos 30 e 60 dias pós tratamento

Intervalo (cm^3)	Escore
0 - 1,37	10
1,37 - 1,46	20
1,41 - 1,55	30
1,44 - 1,64	40

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Bioestat[®] v. 5.9 (UFPA, 2007), aplicando-se o teste não paramétrico de análise de amostras independentes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação da mediana dos postos de Dunn, adotando-se um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 1% ($p \leq 0,01$) para ambas as análises.

Resultados

A densitometria óptica radiográfica das tíbias das coelhas antes da indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose, identificou valores acima de $1,375 \text{ cm}^3$ e abaixo de $1,647 \text{ cm}^3$. O gráfico em vermelho indica que a densidade mineral óssea da tíbia está localizada entre as densidades dos degraus do penetrômetro. Comparando-se a densidade óssea entre as mesmas coelhas, percebe-se a diminuição da densidade óssea em vermelho a patamares inferiores a $1,375 \text{ cm}^3$ após a indução do modelo (Figura 3) (Tabela 2).

Não foi possível mensurar o valor preciso de decaimento da densidade óssea óptica após indução do modelo, devido a densidade observada ser inferior ao último degrau de menor de densidade do penetrômetro, inviabilizando o referencial densitométrico.

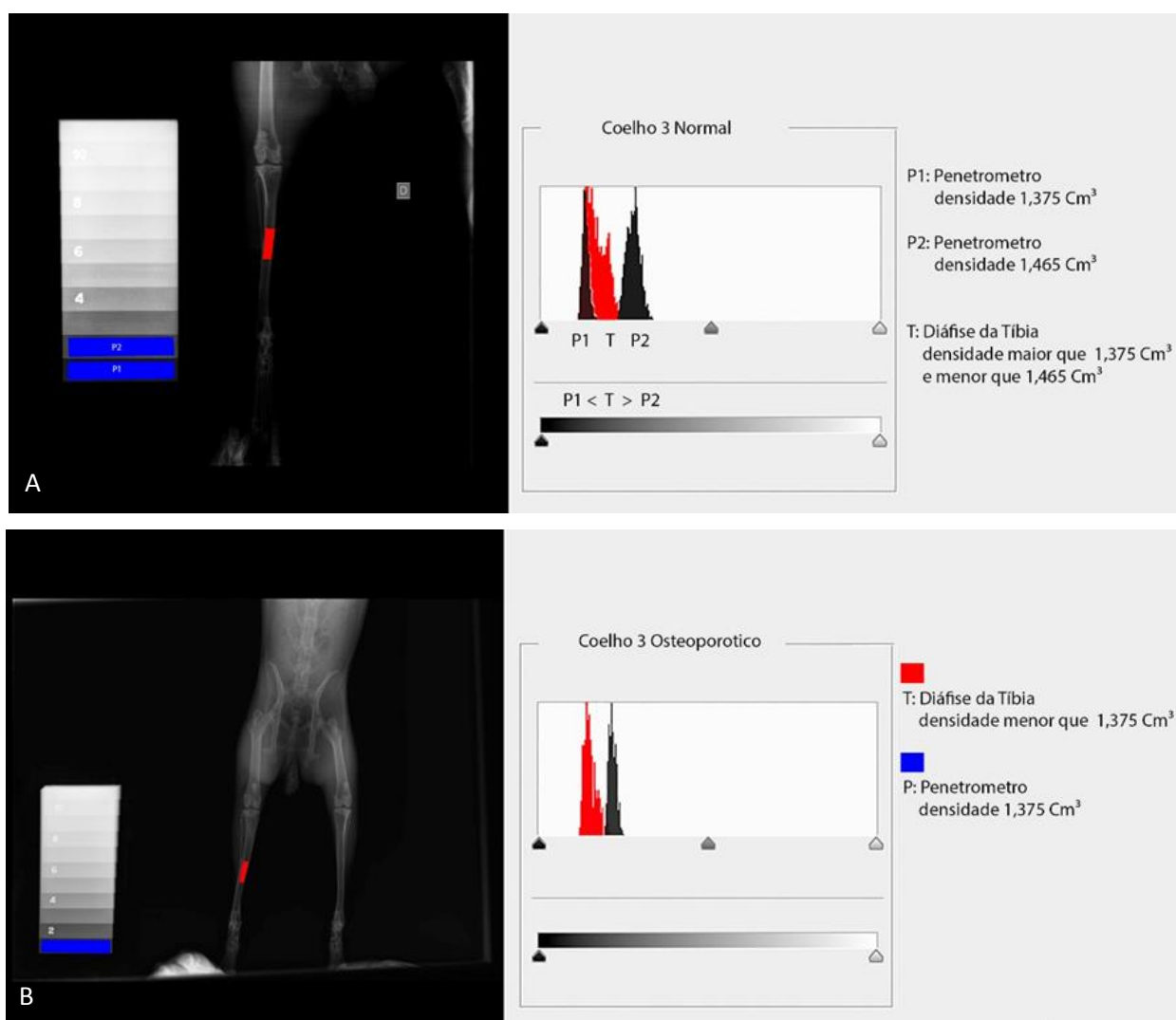


Figura 3. Imagens de densitometria óptica radiográfica da tíbia de uma coelha antes e após a indução de hipercortisolismo e osteoporose. A: Antes da indução do modelo, a densidade óssea é maior que $1,375\text{cm}^3$ e menor que $1,647\text{cm}^3$. B: Após a indução do modelo, a densidade óssea é inferior a $1,375\text{cm}^3$, evidenciando perda da densidade óssea.

Tabela 2. Intervalos de densitometria óptica radiográfica (cm^3) de coelhas adultas nulíparas ovariosalpingohisterectomizadas, antes e após indução de hipercortisolismo iatrogênico e osteoporose, utilizando penetrômetro de alumínio de 11 degraus

	Antes da indução (cm^3)	Após a indução (cm^3)
Animal 1	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 2	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,46$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 3	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 4	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 5	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,46$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 6	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 7	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Animal 8	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,55$	$\mathbf{X} < 1,37$
Média	$1,37 > \mathbf{X} \leq 1,52$	$\mathbf{X} < 1,37$

A adoção da metodologia descrita por Del Carlo *et al.*¹⁴ e Argolo Neto *et al.*²⁰ permitiu a obtenção de um plasma de concentração plaquetária elevado e em volume menor à contagem plaquetária do sangue total. À medida que a amostra foi sequencialmente centrifugada e retiradas as frações hematológica e superficial do plasma, obteve-se um produto exclusivamente composto de plaquetas concentradas com 82% da concentração do volume plaquetário inicial, mas num volume 10 vezes menor que o inicial (Figura 4).

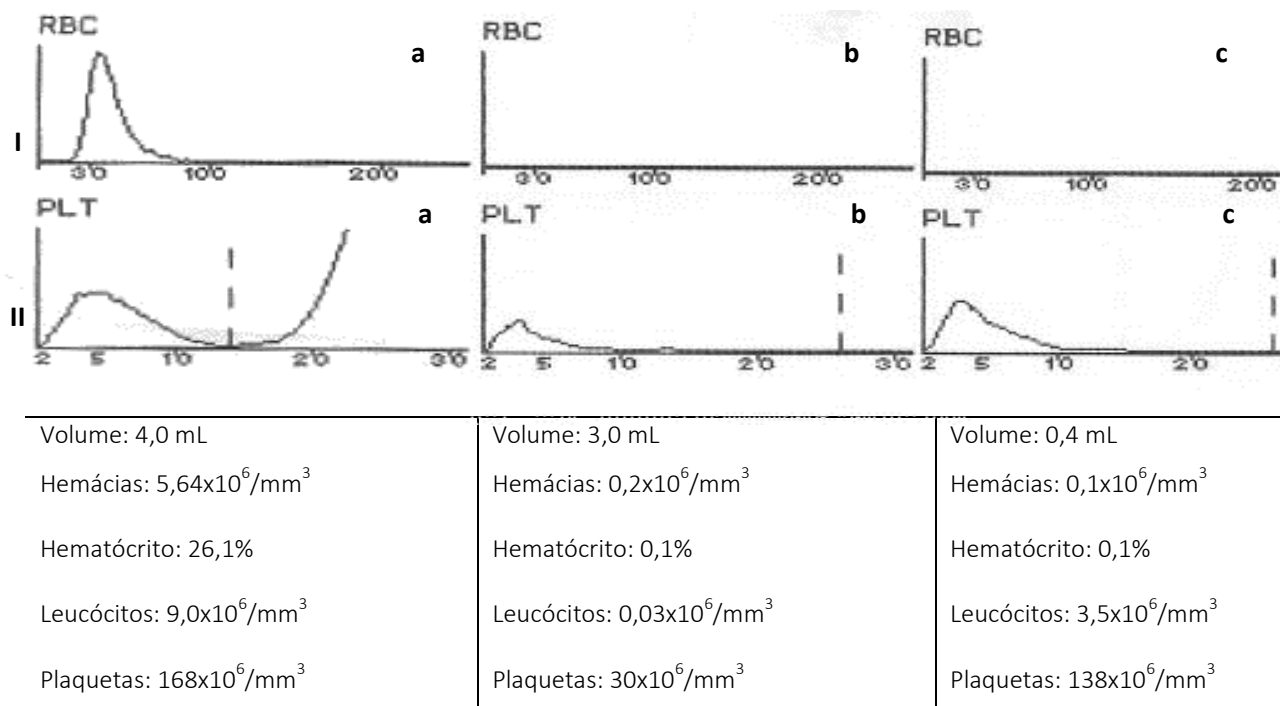


Figura 4. Variação de alguns índices hematológicos em amostra de sangue equino submetida à concentração plasmática de plaquetas. I: Variação dos índices de hemácias e hematócrito no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). II: Variação nos índices de leucócitos e plaquetas no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). Em II a há variação anormal da curva pela presença de agregados plaquetários.

*RBC = Hemácias. PLT = plaquetas

O cultivo de CTM com fragmento de esponja estéril de colágeno hidrolisado identificou que as células aderiram à matriz da esponja após 10 dias de incubação (Figura 5) e a avaliação da viabilidade celular média identificada após a retirada do fragmento foi de 95%.

A avaliação histológica do mesmo fragmento de esponja identificou a presença de células mononucleares aderidas ao substrato do mesmo, com núcleo íntegro e cromatina frouxamente condensada (Figura 6).

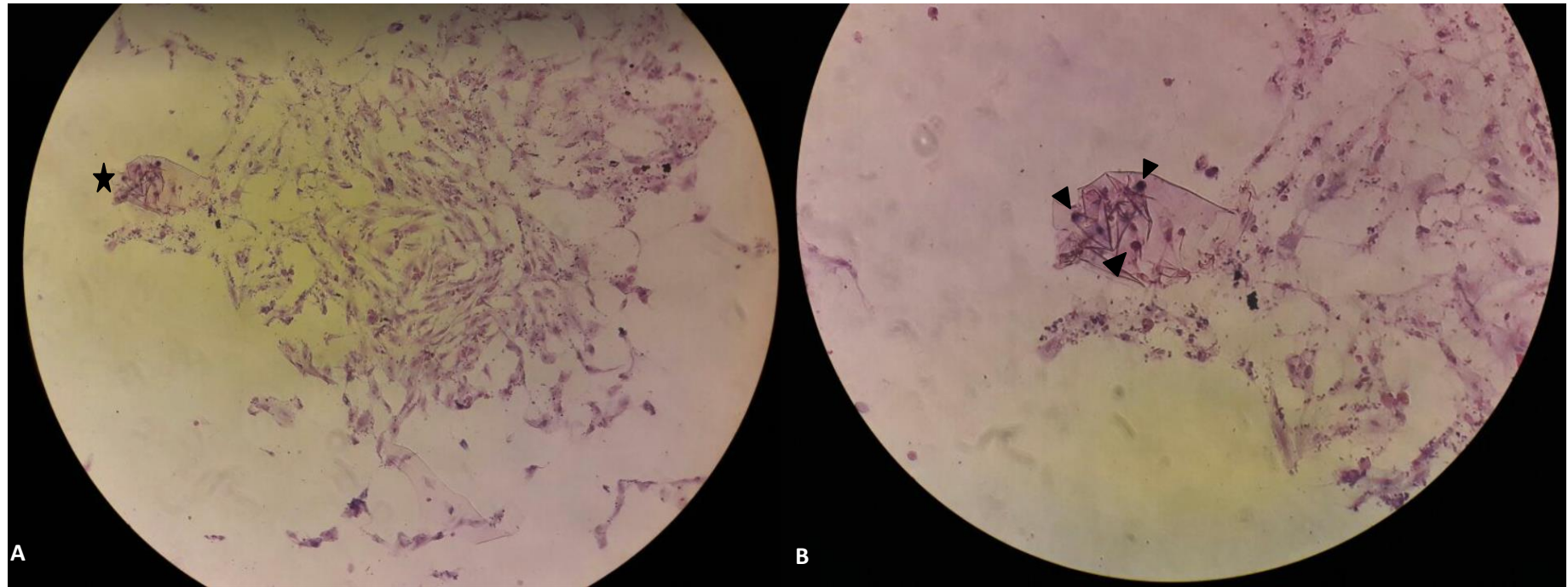


Figura 5. Células-tronco mesenquimais medulares de coelho após 10 dias de cultivo com fragmento estéril de esponja hemostática de colágeno hidrolisada, fixada com paraformaldeído tamponado a 10% e coradas com May-Grunwald Giemsa. A: Colônia uniforme de células de morfologia fibroblastóide, com núcleo central, margeando o fragmento da esponja (★) (20x). B: Maior aumento da imagem anterior. Presença de células mononucleares (▼) sobre o fragmento de esponja (40x).

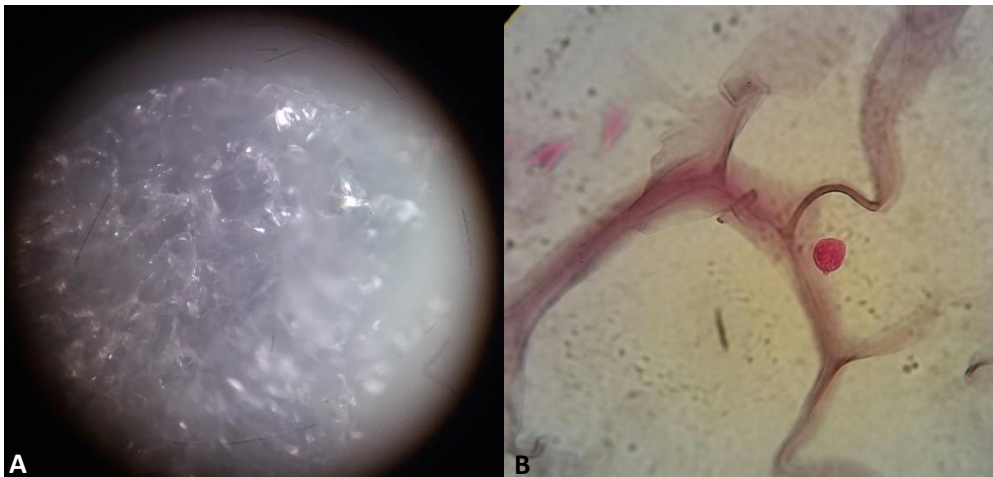


Figura 6. Fotomicrografia de fragmento de esponja hemostática de colágeno hidrolisado. A: Esponja sem tratamento, evidenciando a porosidade e hialinização do material. B: Corte histológico da esponja após 10 dias de incubação em cultura com células-tronco mesenquimais medulares de coelho. Identifica-se presença de célula mononuclear, de cromatina frouxa, aderida às circunvoluções da matriz da esponja (40x).

A densitometria óptica radiográfica do preenchimento das falhas ósseas nas tíbias das coelhas 30 dias após a realização dos tratamentos identificou que as médias dos intervalos densitométricos, em cm^3 , não variaram entre os grupos avaliados (Tabela 3). Quando atribuídos os escores equivalentes (0, 10, 20 e 30) (Tabela 1) e comparados entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos avaliados ($p \leq 0,87$).

Microscopicamente, após 30 dias de tratamento, todas as falhas ósseas de todos os grupos evidenciaram presença de linhas de interrupção de crescimento ósseo, com presença de osso maduro, compostos por osteócitos e organização de tecido ósseo trabecular sem presença de osteoblastos.

Contrariamente, a densitometria após 60 dias de tratamento revelou que, em comparação ao penetrômetro (referencial densitométrico), os animais tratados com CTM, PRP e ASSO apresentaram aumento gradativo da densidade óssea, exceto os animais do grupo CTR. A Figura 7 exemplifica o método de análise densitométrico, tomando-se por parâmetro a falha óssea tratada com CTM, e evidencia a evolução da densidade óssea ao longo de 60 dias. Identificou-se uma relação inversamente proporcional entre radioluscência e densidade óssea das falhas analisadas, na qual quando a radioluscência é máxima a densidade óssea é mínima, sendo o inverso igualmente verdadeiro.

Tabela 3. Intervalos médios da densitometria óptica radiográfica (cm^3) do preenchimento das falhas corticais tibiais de coelhas portadoras de osteoporose, após 30 e 60 dias do tratamento com esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado (CTR), células-tronco mesenquimais (CTM), plasma rico em plaquetas (PRP) e associação (ASSO) entre ambos.

Tratamento	30 dias (cm^3)	60 dias (cm^3)
CTR	$\bar{X} \leq 1,37^b$	$\bar{X} < 1,37^b$
CTM	$1,37 \leq \bar{X} \leq 1,46^b$	$1,37 \leq \bar{X} \leq 1,46^a$
PRP	$1,37 \leq \bar{X} \leq 1,46^b$	$1,37 \leq \bar{X} \leq 1,46^c$
ASSO	$1,37 \leq \bar{X} \leq 1,46^b$	$1,37 \leq \bar{X} \leq 1,46^c$

Pares de médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de significância.

A avaliação do efeito dos tratamentos aos 60 dias identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados ($p \leq 0,008$) (Tabela 3). As maiores médias de densidade óssea foram observadas nos animais tratados com CTM, quando comparado aos demais. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados com PRP e ASSO ($p \leq 0,88$), sendo as menores médias identificadas nos animais tratados com EH (grupo CTR).

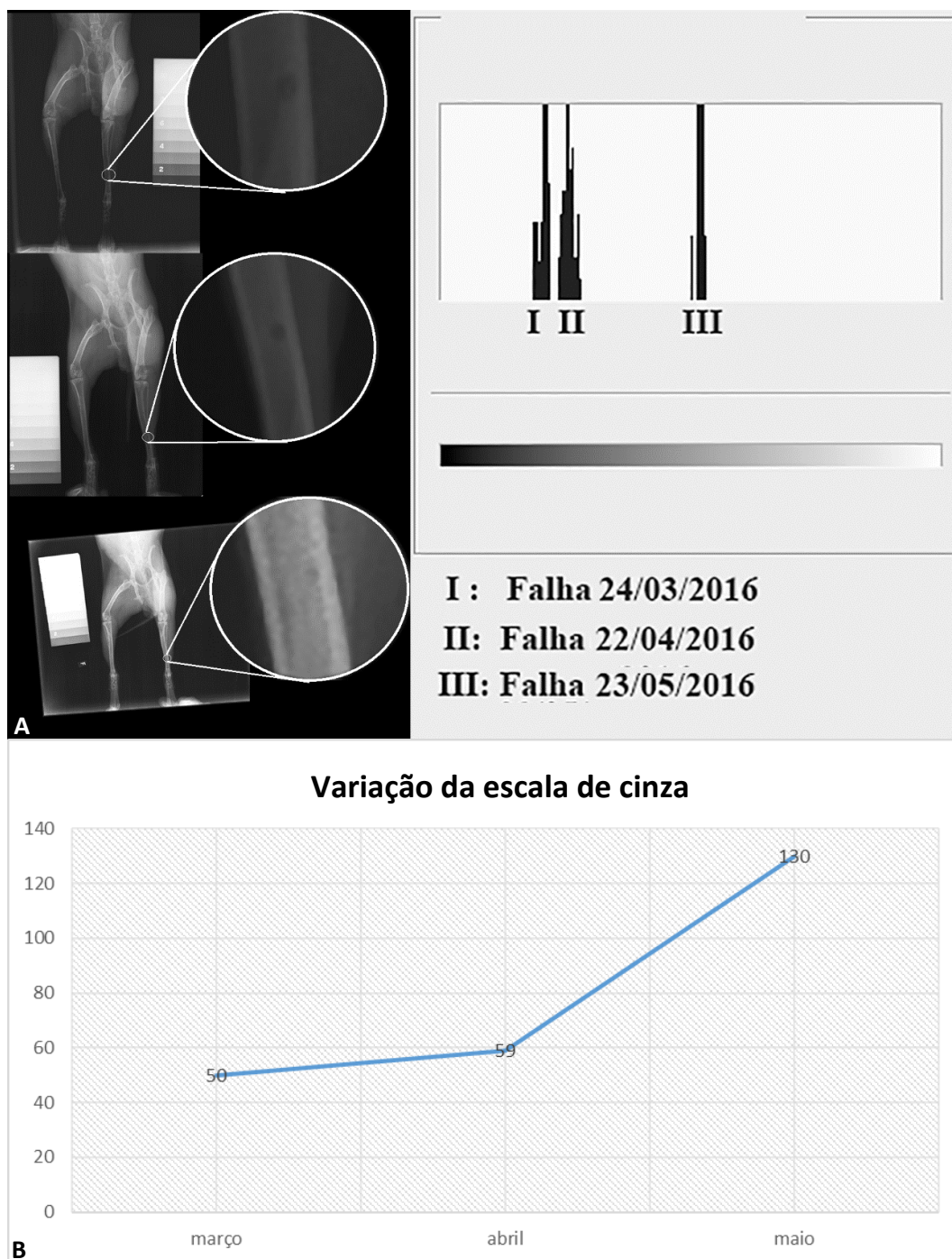


Figura 7. Avaliação densitométrica óptica radiográfica de uma falha óssea tibial de uma coelha tratada com CTM e a variação da escala de cinza correspondente. A: Imagens radiográficas seriadas ao longo de 60 dias, evidenciando a variação máxima da radioluscência da falha óssea com mínima densidade (I e II) e mínima radioluscência com máxima densidade óssea (III). B: Variação da curva de graduação de cinza, correspondente à densidade óssea, ao longo de 60 dias. O tom mais escuro corresponde ao preto e possui valor 0, representando máxima radioluscência da falha óssea. O tom mais claro corresponde ao branco e possui valor máximo de 255, representando mínima radioluscência da falha óssea. A curva evidencia elevação progressiva dos tons de branco ao longo do tempo, caracterizando a elevação gradual da densidade óssea da falha analisada.

Após 60 dias da realização dos tratamentos, identificou-se diferenças histopatológicas na remodelação das falhas ósseas entre os grupos tratados (Figura 8). Observou-se similaridade entre as falhas tratadas com esponja hemostática (grupo CTR) após 60 dias e as falhas ósseas de todos os grupos tratados aos 30 dias, predominando osteócitos em detrimento de osteoblastos. Entre as falhas do grupo CTM, identificou-se presença de osso maduro e imaturo, com linhas de falha de crescimento ósseo evidente e organização de osso trabecular com angiogênese e presença de osteoblastos ativos, sintetizando matriz osteóide. As falhas do grupo PRP apresentaram-se microscopicamente com presença de osso maduro, linhas de falha de crescimento ósseo evidentes e presença moderada de osso imaturo, predominando osteócitos nos campos avaliados. O grupo ASSO apresentou aspectos microscópicos semelhantes ao PRP, mas com presença de osteoblastos no osso trabecular. A tabela 4 apresenta a síntese dos aspectos microscópicos observados nas falhas corticais entre os grupos avaliados.

Tabela 4. Aspectos gerais dos achados histopatológicos, após 60 dias, das falhas corticais tibiais de coelhas portadoras de osteoporose, tratadas com esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado (CTR), células-tronco mesenquimais (CTM), plasma rico em plaquetas (PRP) e associação (ASSO) entre ambos.

GRUPO	ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS
CTR	Tecido ósseo compacto, maduro, com osteopenia e linhas de falha de crescimento
CTM	Tecido ósseo compacto, maduro e imaturo, com linhas de falha de crescimento
PRP	Tecido ósseo compacto e esponjoso, maduro e imaturo, ambos com moderada osteopenia e áreas focais de fibrose
ASSO	Tecido ósseo compacto maduro e imaturo, com moderada osteopenia e áreas focais de fibrose.

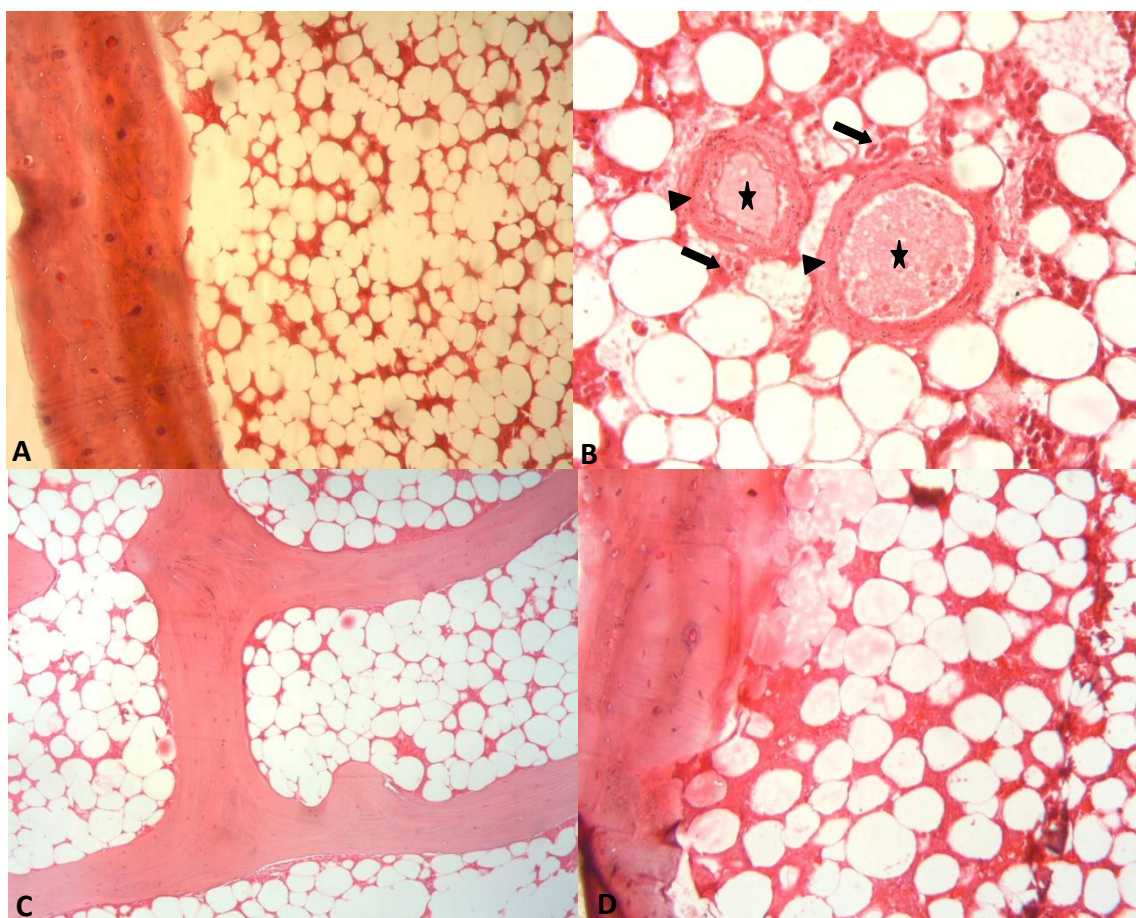


Figura 8. Fotomicrografia de falhas ósseas tibiais de coelhas portadoras de osteoporose induzida após 60 dias de tratamento com esponja estéril de colágeno hidrolisada (CTR), células-tronco mesenquimais heterólogas (CTM) em esponja de colágeno (EH), plasma rico em plaquetas em EH (PRP) e associação entre CTM e PRP em EH. A: Zona limítrofe entre discreto osso compacto maduro e marcante presença de osso trabecular, sem presença de osteoblastos ativos (10x). B: Osso imaturo trabecular com organização de tecido osteóide (▲) adjacente à vasos centrais (★) e presença acentuada de osteoblastos ativos (■) (20x). C e D: Osso maduro compacto e formação abundante de osso trabecular, com raras figuras de osteoblastos (20x).

Discussão

Os dados de densitometria óssea óptica radiográfica obtidos neste estudo (Figura 3) demonstram redução acentuada da densidade óssea da tíbia de todas as coelhas. Esta técnica já havia sido bem descrita em coelhos²², ratos²³, gatos²⁴, equinos²⁵ e seres humanos²⁶, dentre outras espécies. Para minimizar a possibilidade de erros de padronização radiográfica, utilizou-se um penetrômetro de alumínio ultra purificado de 11 degraus como referencial densitométrico, conforme proposto por Louzada²². Segundo este autor, esta técnica apresenta elevada sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, fidelidade, fácil exequibilidade e baixo custo e sendo

amplamente descrita por outros pesquisadores, sobretudo aplicada a coelhas portadores de osteoporose induzida²⁷, fato que justifica sua adoção na metodologia ora apresentada neste estudo.

Neste estudo, todas as coelhas induzidas à hipercortisolismo e osteoporose apresentaram densidades ósseas médias inferiores a 1,37 cm³, tendo o último degrau de menor densidade do penetrômetro como referencial densitométrico. Nesse aspecto, identifica-se limitação do método proposto quando se utiliza um penetrômetro de apenas 11 degraus, por não ser possível precisar com exatidão os valores abaixo desse patamar. Possivelmente, a adoção de um penetrômetro com 21 degraus ou mais permitir-nos-ia uma avaliação de maior acurácia. Contudo, este fato não oblitera a observação de que a associação entre ovariosalpingohisterectomia e administração de corticoide induz redução acentuada da densidade óssea.

Para o estudo da reparação óssea no osso fragilizado pelo estabelecimento da osteoporose secundária, buscou-se um carreador adequado para os tratamentos propostos, visto que tanto CTM quanto PRP estão vinculados em meio líquido de solução salina tamponada e plasma, respectivamente. De forma ideal, buscou-se um carreador ou *scaffold* que não desencadeasse resposta inflamatória local, cujo tempo de degradação do carreador não interferisse no processo de reparação ósseo e que apresentasse propriedades mecânicas adequadas à aplicação em falhas ósseas, conforme previamente descrito em estudos contemporâneos^{28,29}.

No presente trabalho, optou-se pelo uso de uma esponja de colágeno hidrolisado² produzida a partir de gelatina porcina estéril liofilizada, com características hemostáticas, capaz de absorver 40 a 50 vezes o próprio peso e com período de absorção de aproximadamente 15 dias, de acordo com as informações do fabricante.

O ensaio *in vitro* de biocompatibilidade entre CTM e um fragmento da esponja demonstrou que não houve efeito citotóxico aparente da mesma sobre as células, visto que identificou-se CTM em cultivo aderidas ao fragmento, com manutenção da viabilidade celular em 95% (Figura 5). Analogamente, identificou-se células aderidas ao substrato do fragmento após processamento histológico, denotando que a matriz do substrato proporciona ambiente favorável à aderência celular (Figura 6).

Contudo, identificou-se alteração na morfologia celular nas células aderidas. Tal efeito era esperado, visto as CTM são células mononucleares aderentes que assumem morfologia fibroblástóide ou fusiforme apenas quando em superfície regular de cultivo, como as condições de incubação controlada¹⁰. Sendo a superfície porosa da esponja hemostática irregular (Figura 6), a CTM foi visualizada sob forma mononuclear oval.

O uso de esponjas hemostáticas como *scaffold* para estudos com reparação de falhas ósseas já havia sido descrito em pesquisas anteriores, tanto em humanos quanto em animais, corroborando para justificar a escolha deste substrato para o modelo ora apresentado^{30,31,32}.

Contrariamente, a escolha da apresentação xenogênica do PRP adotada no presente estudo contraria as principais observações científicas descritas^{29,33}. Segundo estes autores, o PRP xenogênico apresenta elevado fator imunogênico, quando comparado às apresentações heterólogas e autógenas. Contudo, sendo uma das principais limitações ao uso clínico do PRP o baixo rendimento quando comparado ao volume da amostra de plasma inicial¹⁰, sobretudo para infusão em áreas teciduais extensas, torna-se urgente a busca por alternativas que permitam a obtenção de maiores volumes de PRP para uso contínuo. Dada aos escassos estudos, tanto em medicina humana quanto veterinária, sobre a temática, propôs-se a utilização de PRP obtido de um animal de grande porte no modelo de osteoporose da presente pesquisa.

O processamento do plasma identificou relação inversa entre contagem de hemácias e plaquetas, embora tenha identificado relação proporcionalmente direta entre contagem de leucócitos e plaquetas (Figura 4). Tal relação já foi previamente descrita em estudos anteriores, utilizando plasmas humanos e animais como amostra^{14,29}. Segundo estes autores, durante o processo de centrifugação, as plaquetas são depositadas juntamente com os leucócitos sobre as hemácias, formando um halo esbranquiçado. Desta forma, quanto mais eficaz a técnica de pipetagem do halo formado, menor percentual de hemácias e maior percentual de leucócitos são identificados. Este resultado pode ser utilizado como uma variante de exclusão para determinação da qualidade do PRP produzido e reitera a eficácia da metodologia adotada no presente estudo para tal.

O efeito dos tratamentos sobre o preenchimento das falhas ósseas foi avaliado densitométrica e histopatologicamente. Os resultados obtidos com a densitometria óptica radiográfica permitem inferir que não há remodelação óssea radiograficamente evidente em até 30 dias pós tratamento para todos os grupos avaliados ($p \leq 0,87$). A densidade óssea observada apresentou-se variando entre valores abaixo de $1,375\text{cm}^3$ e até $1,465\text{cm}^3$, correspondente ao último e penúltimo degrau do penetrômetro, tomado como referencial densitométrico. Estudos prévios já haviam descrito, em coelhos e camundongos, nos primeiros 30 dias após realização de falhas ósseas em pacientes saudáveis ou não, a presença preponderante de tecido conjuntivo fibroso, associado a intensa infiltração inflamatória mista nos locais das falhas^{13,14}. Os referidos autores também utilizaram CTM e PRP como tratamentos às falhas ósseas analisadas, fato que

corroborar, com os achados densitométricos do presente estudo, sugerindo escassa mineralização óssea local.

Tal hipótese é sustentada pelos achados histopatológicos, nos quais identificou-se presença de linhas de interrupção de crescimento ósseo, com presença de osso maduro, compostos por osteócitos e organização de tecido ósseo trabecular sem presença de osteoblastos, em todos os tratamentos analisados. As linhas de interrupção de crescimento ósseo evidenciam que o processo de produção de matriz osteóide foi interrompido abruptamente e retomado em momento posterior, conforme descrições prévias^{13,34}. Contudo, neste estudo, não foi observado infiltrado inflamatório local, mas tão somente formação trabecular grosseira e porosa, sem presença de osteoblastos. Este resultado sugere baixa ou inexistente formação de matriz osteóide e, por conseguinte, provável baixa estabilidade estrutural. Estas observações estão em consonância com descrições prévias de anormalidade histopatológicas comumente identificadas em ossos com déficit de mineralização, como na osteoporose^{2,5}.

Ressalta-se que a descrição histológica da tíbia de coelhos saudáveis diverge dos achados histopatológicos nas falhas com até 30 dias de tratamento³⁵. Segundo estes autores, a estrutura microscópica da tíbia saudável é composta por osso maduro bem compactado, com osteoblastos ativos difusamente distribuídos na interface entre o osso compacto e o osso trabecular abundante, bem como na superfície das trabéculas, organizando-se em ilhas de ossificação e nas adjacências de vasos sanguíneos.

Dada a existência de descrição histológica prévia da tíbia de coelhos e atendendo a premissa de redução, refinamento e substituição para o bem estar de animais utilizados em pesquisas, optou-se não utilizar um grupo de animais saudáveis para estudo histopatológico.

Diametralmente ao observado aos 30 dias, identificou-se diferenças densitométricas significativas entre os tratamentos após 60 dias de observação ($p \leq 0,008$) (Tabela 3). O grupo CTR apresentou a menor densidade óssea, em cm^3 , quando comparado aos demais, no menor intervalo densitométrico escalonado no penetrômetro. Esta observação evidencia ineficácia do tratamento em induzir consolidação da falha óssea. Estudos prévios também obtiveram resultados semelhantes em coelhos e humanos, utilizando esponja hemostática de colágeno hidrolisado, demonstrando que a mesma não contribuiu significativamente para a reparação óssea^{31,32}.

Os achados histopatológicos do grupo CTR corroboram às observações densitométricas, dada a similaridade dos aspectos histopatológicos aos 30 e 60 dias para este tratamento. Este

resultado reitera a formação trabecular porosa e a sugestão de baixa síntese de osso osteóide, condizente com a estrutura de um osso mal mineralizado⁵.

Parece-nos evidente que a esponja hemostática de colágeno hidrolisado comportou-se de forma inócua ao processo de remodelação óssea, pois apesar de não contribuir ao aumento da radiopacidade densitométrica, não contribuiu para a reabsorção óssea, dado ter sido identificado histopatologicamente áreas similares de osso maduro compacto aos 60 dias de observação comparado aos demais tratamentos aos 30 dias.

O grupo CTM apresentou os maiores índices densitométricos, quando comparado aos demais tratamentos, após 60 dias de observação, conforme determinado pelo teste de mediana de Dunn (Figura 7). As falhas ósseas tíbias dos animais desse grupo apresentaram maior radiopacidade que os demais tratamentos ($p \leq 0,008$). A curva de graduação de cinza elevou-se progressivamente a partir de 50 tons, mais próximo da cor preta e portanto com menor densidade óssea, para o valor final de 130 tons, mais próximo da cor branca, evidenciando maior densidade do tecido na escala densitométrica adotada.

O aumento da densidade óssea no grupo CTM justifica-se pelos achados histopatológicos da presença de osso maduro e imaturo, com linhas de falha de crescimento ósseo evidente e organização de osso trabecular com angiogênese e presença de osteoblastos ativos, sintetizando matriz osteóide (Figura 8). A presença das linhas de falha de crescimento indica interrupção e retomada do processo de osteogênese, o qual pode ser desencadeado pelo quadro de osteoporose secundária conforme sugerido em estudo recente². Ressalta-se evidente angiogênese observada no osso trabecular, indicativo da fase aguda de reparação óssea, com estruturação de matriz osteóide trançada imatura imediatamente adjacente aos vasos sanguíneos e infiltrado massivo de osteoblastos ativos, sugerindo serem estes os responsáveis pela deposição de matriz observada. Estas características sugerem intensificação do processo de reparação óssea, em fase de remodelagem, visto não ter sido identificado infiltrado inflamatório, conforme descrito anteriormente^{13,34}.

O efeito das CTM na reparação tecidual óssea já havia sido descrito em estudos contemporâneos^{13,20}. Segundo estes autores, as CTM são células progenitoras somáticas multipotentes, capazes de originar tecidos mesodermis e não mesodermis. A diferenciação destas células *in vitro* em osteoblastos, foi induzida em diversas pesquisas anteriores^{10,11}. No presente estudo, amostras das CTM utilizadas apresentaram resposta positiva ao ensaio *in vitro* de diferenciação osteogênica realizado previamente pela equipe do NUPCelt/UFPI, reiterando a plasticidade das mesmas para o tecido ósseo.

Dada a osteopenia presente nos animais do presente estudo decorrente da osteoporose secundária e ausência de observação microscópica de componente celular inflamatório nas falhas avaliadas no grupo CTM, suscita-se maior plausibilidade de diferenciação das CTM *in vivo* em linhagem osteoblástica, que o estímulo quimiotático das mesmas para atração de osteoblastos equidistantes. Por seguinte, a presença maciça de osteoblastos ativos e matriz osteóide depositada sugere conseqüente maior deposição mineral, o que justificaria a elevação densitométrica observada.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,87$) entre os grupos PRP e ASSO, ao teste de Dunn, quanto à densitometria óptica radiográfica mensurada nas falhas ósseas (Tabela 3).

Histopatologicamente, observou-se que as falhas do grupo PRP apresentaram-se microscopicamente com presença de osso maduro, linhas de falha de crescimento ósseo evidentes e presença moderada de osso imaturo, predominando osteócitos nos campos avaliados. O grupo ASSO apresentou aspectos microscópicos semelhantes ao PRP, mas com presença de osteoblastos no osso trabecular (Figura 8). Tais características denotam presença de osteopenia nos dois grupos, sobretudo no grupo PRP (Tabela 4). Características de osteopenia já haviam sido descritas em estudos anteriores, caracterizada pelo aumento do osso trabecular, em detrimento do osso compacto e a ausência de angiogênese e osteoblastos ativos sintetizando matriz osteóide, induzindo fragilidade óssea^{5,34}. A presença de osteopenia corrobora os achados densitométricos de densidade intermediária, quando comparados estes grupos com os grupos CTR e CTM.

Os resultados obtidos sugerem que o PRP contribuiu positivamente à reparação da falha óssea, mas de forma inferior ao grupo tratado com CTM e em intensidade semelhante ao grupo ASSO. As plaquetas têm sido descritas como ricas em fatores de crescimento e citocinas pró-epitelizantes, sendo ativadas por contato¹³. No presente estudo, estima-se que a esponja de colágeno hidrolisado, como fator exógeno, tenha contribuído para a ativação mecânica por contato das plaquetas presentes no PRP utilizado, favorecendo a liberação dos fatores de crescimento imediatamente à implantação cirúrgica dos fragmentos de esponja nas falhas ósseas.

Contrariamente ao referido anteriormente^{29,33}, não foram identificadas características histopatológicas que sugerissem aumento da reabsorção óssea mediada por imunogenicidade pelo PRP xenogênico. Contudo, considera-se o resultado obtido preliminar, não sendo possível inferências fidedignas quanto a resposta imunológica ao PRP xenogênico. Carecem estudos posteriores para mensuração dos perfis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias induzido pela

infusão de PRP em falhas ósseas, para elucidar tais questões. Ainda assim o presente estudo demonstrou que o PRP xenogênico não induziu à elevação da reabsorção óssea.

Quando em associação com CTM (grupo ASSO), não se observou benefício densitométrico ou histopatológico da interação entre PRP xenogênico e CTM heterólogas (Tabela 3). Embora o grupo ASSO tenha apresentado densitometria superior ao grupo CTR, com menor osteopenia que o mesmo, os resultados obtidos foram inferiores quando comparados ao tratamento exclusivo com CTM heterólogas. Dado que a mesma linhagem celular foi utilizada, atribui-se a menor contribuição do grupo ASSO à possível interação negativa com o PRP xenogênico.

Presume-se a possibilidade dos fatores de crescimento e citocinas liberados pelas plaquetas terem inibido a diferenciação das CTM, decorrente da característica xenogênica do mesmo. Embora as CTM não expressem complexo maior de histocompatibilidade¹³, não foram identificados na literatura científica consultada pesquisas que abordem a resposta de CTM à estímulos xenogênicos. O presente estudo suscita, portanto, relevante questionamento acerca da interação de CTM e perfis xenogênicos de citocinas e fatores de crescimento, os quais devem ser elucidados em pesquisas posteriores para aperfeiçoamento do modelo ora proposto.

Conclusão

A densitometria óptica radiográfica utilizando-se um penetrômetro de alumínio como referencial densitométrico constituiu-se em técnica sensível, eficaz e de fácil exequibilidade para identificação de redução da densidade óssea em tíbias de coelhas portadoras de osteoporose secundária.

A esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado apresentou biocompatibilidade favorável com as células-tronco mesenquimais heterólogas utilizadas, permitindo a adesão das mesmas e preservando sua viabilidade.

O tratamento das falhas ósseas com células-tronco mesenquimais heterólogas carregadas em fragmento de esponja hemostática estéril, induziu maior elevação da densitometria óptica radiográfica com maior deposição microscópica de matriz osteóide, quando comparado aos demais tratamentos.

Referências

1. Patrício JP, Oliveira P, Faria MT, Pérez MB, Pereira J. Osteoporose induzida por corticóides. *Arqui Med.* 2006 Jul; 20(5-6): 173-8.
2. Silva ACV, Rosa MI, Fernandes B, Lumertz S, Diniz RM, Damiani MEFR. Fatores associados à osteopenia e osteoporose em mulheres submetidas à densitometria óssea. *Rev Bras Reumatol.* 2015 May/Jun; 55(3): 223–228.
- 3 Lanna CMM, Montenegro Jr. RM, Paula FJA. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticoide. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003 Fev; 47(1): 9-18.
4. Romanholi DJPC, Salgado LR. Síndrome de cushing exógena e retirada de glicocorticoides. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007 Nov; 51(8): 1280-1292.
5. Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006 Fev; 42(1): 5-12.
6. Kowalski SC, Sjenzfeld VL, Ferraz MB. Utilização de recursos e custos em osteoporose. *Ver Ass Med.* 2001 Ago; 47(4): 352-357.
8. Pozzi S, Marcheselli R, Sacchi S, Baldini L, Angrilli F, Pennese E, Quarta G, Stelitano C, Caparotti G, Luminari S, Musto P, Natale D, Broglia C, Cuoghi A, Dini D, Di Tonno P, Leonardi G, Pianezze G, Pitini V, Polimeno G, Ponchio L, Masini L, Musso M, Spriano M, Pollastri G Biphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma.* 2007 Jul; 48(1): 56-64.
9. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. *Rev Bras Reumatol.* 2011 Apr; 51(4): 365-82.
10. Argôlo Neto NM, Feitosa MLT, Sousa SS, Fernandes PB, Pessoa GT, Bezerra DO, Almeida HM, Carvalho YKP, Rocha AR, Silva LMC, Carvalho MAM. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Sci Vet.* 2016 Jan; 44: 1-11.
11. Carvalho YKP, Argôlo Neto NM, Ambrósio CE, Oliveira LJ, Rocha AR, Silva JB, Carvalho AAM, Alves FR. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). *Pesq Vet Bras.* 2015 Jun; 35(6): 590-598.

12. Zamprogno H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Sci Vet.* 2007 Nov; 35: 289-290.
13. Monteiro BS, Del Carlo RJ, Argôlo Neto NM, Nardi NB, Carvalho PH, Bonfá LP, Chagastelles PC, Moreira HN, Vitoria MIV, Santos BS. Association of mesenchymal stem cells with platelet rich plasma on the repair of critical calvarial defects in mice. *Acta Cir Bras.* 2012 Mar; 27(3): 201-209.
14. Del Carlo RJ, Monteiro BS, Silva PSA, Argolo N, Serakides R. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e autoenxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. *Vet e Zootec.* 2009 Mar; 16(1): 152-160.
15. Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Ciênc Rural.* 2010 Set; 40(1), 238-245.
16. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RSB, Ruben JL, Van Der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.* 2005 Mar; 16(3): 349-356.
18. Bueno CM, Cerejo AS, Miguel MP, Franco LG, Honsho CS. Utilização do 2-octil-cianoacrilato na ovariectomia de coelhas, comparativamente ao fio de náilon: análise de tempo e alterações macroscópicas. *E Biosfera.* 2012 Nov; 8(15): 1657-1671.
20. Argôlo Neto NM, Del Carlo RJ, Monteiro BS, Nardi NB, Chagastelles PC, de Brito AFS, Reis AMS. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clin Exp Dermatol.* 2012 Jul; 37(5): 544-553.
21. Cunha AP., Bello ACPP, Leite RC, Melo MM, Braz GF, Ribeiro ACCL, Oliveira PR. Avaliação de parâmetros clínicos e hematológicos de equinos submetidos a um programa de controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008 Fev; 60(1): 113-120.
22. Louzada MJQ. Densitometria óptica radiográfica na mensuração da densidade mineral óssea de coelhos em crescimento. *Ars Vet.* 2002 Fev; 18(2), 107-110.
23. Silva ARS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia AMP, Sundefeld MLMM. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. *Rev Odonto Ciênc.* 2007 Jan/Mar; 22(55), 77-81.
24. Rahal SC, Mortari AC, Caporali EHG, Vulcano LC, Santos FAM, Takahira RK, Crocci AJ. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. *Cienc. Rural.* 2002 Agost; 32(3), 421-

25. Godoy CLB, Vulcano LC, Santos FAM, Soares JCM. Valores normais da densidade mineral óssea do acessório do carpo em equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH) determinados por meio da densitometria óptica em imagem radiográfica. *Cienc. Rural*. 2005 Mai/Jun; 35(3), 607-610.
26. Canali GD, Takahashi CM, Mello AS, Costa MB, Souza PHC, Tolazzi AL, Westphalen VPD, Westphalen FH. Estudo comparativo da densidade óptica óssea obtida em radiografias panorâmicas e da densitometria óssea em mulheres histerectomizadas e não histerectomizadas. *Rev. Fac. Odontol. UPF* 2011 Mai; 16(2), 149-153.
27. Costa PHC, Widmer ADSA, Valente FL, Sepúlveda RV, Perdigão APL, Borges A PB. (2015, Novembro). Avaliação radiográfica de um modelo experimental para indução da osteoporose em coelhos. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Curitiba, PR.
28. Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, Santos Júnior EB, Rappeti J, Trindade LB, Tognoli GK, Pippi NL, Sausen L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010 Fev; 62(1), 72-79.
29. Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA, Hussni, CA, Alves AL. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesq Vet Bras* 2016 Jun; 36(6), 461-467.
30. Berenguel, I. A. Implantes das esponjas hemostáticas Gelfoam e Hemospon em alvéolos dentais em ratos após exodontia. Estudo histológico e histométrico comparativo. Diss. Dissertação (Mestrado) Fac Odontol Marília, Unimar, Marília SP, 2006, 108p.
31. Gabrielli MAC, Hochuli-Vieira E, Paleari AG, Cerri P. S., Klüppel LE. Avaliação histológica de agentes hemostáticos implantados em mandíbulas de coelhos. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-fac*. 2009 Abr./Jun; 9(2), 97-106.
33. Moshiri A, Oryan A. Role of platelet rich plasma in soft and hard connective tissue healing: an evidence based review from basic to clinical application. *Hard Tissue*. 2013 Jan; 2(1), 6.
34. Moreira R, Dória RG, Camargo LM, Santos MD, Minto BW, De Nardi AB, Ambrósio CE, Freitas SH. Aspecto radiológico e macroscópico de matriz óssea mineralizada heteróloga fragmentada e polimetilmetacrilato autoclavados em falha óssea de tíbia de coelho. *Pesq Vet Bras* 2014 Fev; 34(2), 173-178.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esperou-se com o desenvolvimento dessa pesquisa contribuir ao estudo da osteoporose, testando um modelo de indução secundária à hipercortisolismo iatrogênico, avaliando a aplicabilidade da densitometria óptica radiográfica com interpretação computadorizada por escala de cinza e comparando alternativas de terapia celular para o tratamento de falhas ósseas no modelo adotado.

A execução da técnica de densitometria óptica demonstrou ser facilmente exequível, sensível e eficaz na detecção da redução de densidade mineral óssea das coelhas com osteoporose secundária.

Considerou-se que a metodologia de comparação entre os tratamentos propostos foi satisfatória, fornecendo resultados concisos sobre o efeito das células-tronco mesenquimais heterólogas, do plasma rico em plaquetas xenogênico, e da associação entre ambos, na reparação de falhas ósseas em coelhas portadoras de osteoporose secundária.

Dentre os tratamentos utilizados, a infusão de células-tronco mesenquimais obteve o melhor resultado, pois quando comparado aos demais tratamentos, verificou-se elevação da densidade óssea e evidências microscópicas de presença de tecido ósseo maduro e imaturo, com osteoblastos ativos organizados adjacentes à vasos sanguíneos, produzindo matriz osteóide.

A esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado apresentou biocompatibilidade com as células-tronco mesenquimais utilizadas e demonstrou ser um eficiente carreador para os tratamentos propostos.

Ademais, julga-se que os dados obtidos foram pertinentes e relevantes ao estudo da osteoporose em modelos em lagomorfos, podendo vir a contribuir positivamente com estudos futuros sobre a temática.