

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS PITELLI ZAMARIAN

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO DE REPARO EM FALHAS
ÓSSEAS INDUZIDAS EM TÍBIAS DE COELHOS TRATADOS COM
DECANOATO DE NANDROLONA

PALOTINA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS PITELLI ZAMARIAN

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO DE REPARO EM FALHAS
ÓSSEAS INDUZIDAS EM TÍBIAS DE COELHOS TRATADOS COM
DECANOATO DE NANDROLONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração de Saúde Animal, linha de pesquisa em Patologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro

Co- Orientador: Prof^o Dr. Olicies da Cunha

PALOTINA

2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

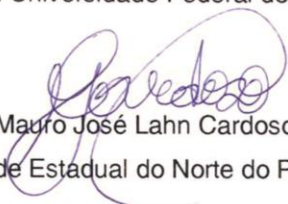
THAÍS PITELLI ZAMARIAN


“AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO DE REPARO DE FALHAS ÓSSEAS
INDUZIDAS EM TÍBIAS DE COELHOS TRATADOS COM DECANOATO DE
NANDROLONA”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Professor. Dr. Olícius da Cunha

Presidente/Orientador: Universidade Federal do Paraná


Professor. Dr. Mauro José Lahn Cardoso
Membro: Universidade Estadual do Norte do Paraná


Professora Dra. Aline De Marco Viott
Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 24 de novembro de 2014

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Thaís Pitelli Zamarian, filha de Horliza Maria de Almeida Pitelli e Nelson Zamarian nasceu em Cornélio Procópio - Paraná em 21 de dezembro de 1986. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte do Paraná em 2008. Na sequência, ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional pela mesma instituição na área de clínica e cirurgia de pequenos animais (2009-2011) e concluiu o curso de especialização lato sensu em Ortopedia Veterinária pela Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais – São Paulo no ano de 2012. Foi mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal de março/2013 a dezembro/2014. Profissionalmente, trabalhou como Professora e Médica Veterinária no Hospital Veterinário da Universidade Paranaense – UNIPAR, em Umuarama /PR, no período de 2011 a 2014, ministrando as disciplinas de Práticas Hospitalares, Patologia Cirúrgica e Oftalmologia. Atualmente, atua na clínica privada nas áreas de cirurgia geral e ortopedia de cães e gatos e é membro ativo da Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen - AOVET e da Associação Brasileira de Ortopedia e Traumatologia Veterinária.

“A falha do planejamento é o planejamento da falha”

Louic de Jardin

Sempre ela o motivo das minhas dedicatórias. Quem dedica uma vida à nós, filhas, não poderia deixar de ser o sentido de todas as minhas conquistas. Sempre ao meu lado para o que der e vier, minha mãe, meu exemplo de mulher, de caráter, de pessoa e de vida. Amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

Chegar até o fim de mais esta etapa não teria sido possível se não fossem meus alicerces do dia a dia. Foram praticamente dois anos nessa jornada e que tive ao meu lado pessoas indispensáveis.

Minha mãe, minha base. Capaz de um sentimento individual em cada conquista minha, o orgulho. Vê-lo estampado no seu rosto com um misto de felicidade é o que me rege nas conquistas pessoais e profissionais. Quanta preocupação em cada quilômetro rodado e quantas vezes me deu ouvidos para as minhas dúvidas e angústias. Obrigada, minha mãe, pelo amor e apoio incondicionais e só espero que Deus me dê sempre oportunidades e condições de ser protagonista dos seus melhores sentimentos. Amo você acima de tudo e de todos.

Uma vida sem amigos não têm a mínima graça! Cheguei em Umuarama sem conhecer nada nem ninguém e ali vivi três anos ao lado de pessoas incríveis e que me renderam laços para uma vida toda. Somos tão diferentes porém ao mesmo tempo tão iguais em alguns aspectos... Só elas viveram o meu dia a dia e acompanharam o quanto me desdobrei para conseguir administrar o tempo e obrigações as quais tinha me proposto.

Posso dizer que ganhei 3 irmãs: Rita, Erika e Paty. Patrícia com sua superproteção materna, cuidando dos meus horários e me obrigando a almoçar e jantar para não ficar doente e quando algo dava errado, era ela quem estava ali para mostrar, sempre prática, a solução no fim do túnel. Rita, taí uma amizade que não tinha nada para acontecer, fenótipos opostos mas uma afinidade fraterna sempre nos colocou lado a lado. Cada conselho seu, sem hipocrisia e de uma franqueza inigualável, foram subsídios para meu crescimento pessoal e profissional, até mesmo as bolachas que enfiava na minha bolsa quando saía correndo para Palotina. Dona Erika, quantas horas me ouviu, cedo ou tarde da noite, por telefone ou nas caminhadas e passeios. Meu ombro amigo, minha companheira para todas as horas, com um humor impecável, e sempre pronta para tudo, seja para picar uma cebola para a salada de tomate do churrascos da empresa até para me ajudar com um

pacote de provas ou para um passeio no Paraguai. Quantas histórias teremos para contar, vivenciamos fases semelhantes sendo cúmplices e dividindo praticamente as mesmas inseguranças e novidades. Ah! minhas queridas amigas, quantas broncas, quantas risadas, quantas histórias! Meu muito obrigada por tudo que fizeram e torceram por mim, levo no coração cada uma de vocês...

De repente, no meio do caminho, Deus me deu um presente. Acredito que estava guardado para mim a vida toda e na melhor hora Ele me mostrou. Marcos, meu amor, só tenho a lhe agradecer por tudo que você me apoiou. Quanta gaiola de coelho você ajeitou no meu carro e quanta aflição passou com minhas viagens e correrias nessa estrada. Nós dois sabemos quanta dificuldades passamos para tentar conciliar nosso tempo com compromissos profissionais e nem sempre conseguimos tão bem. Quantas vezes você teve que me esperar chegar tarde em um sábado por causa de uma cirurgia, sair cedo em um domingo por conta do trabalho e mal nos falarmos por telefone durante a semana por conta das aulas e do mestrado. Obrigada pela paciência inigualável, por entender minha ausência física e mental em alguns momentos e me fazer uma pessoa melhor a cada dia. Nada do que estamos vivendo hoje teria valor e sentido se não fossem as lombadas no meio do caminho... Amo você.

O trabalho em equipe viabiliza, qualifica e enobrece. Só tenho a agradecer aqueles que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa dividindo comigo muitas responsabilidades. Manejar os animais de forma tão cuidadosa e com conhecimento baseado não teria sido possível sem a orientação do Professor Anderson com seus residentes Laura e Everton e o comprometimento das alunas Beatriz, Priscila e Patrícia, que representam a linha de frente nos cuidados com os animais, sem medirem esforços para o bem estar destes.

Sem palavras para agradecer a professora Fabíola que aceitou de prontidão o convite e abriu mão do seu tempo e, até do seu próprio pós operatório em casa, para nos ajudar, com a maior paciência e delicadeza que já vi. Obrigada professora por tornar os procedimentos cirúrgicos, momentos além de profissionais, extremamente agradáveis e enriquecedores com o seu

conhecimento.

Confesso que desde o início do projeto o momento mais temido por mim foi a fase laboratorial. Distante do universo de lâminas e microscopia, sabia que as limitações seriam óbvias. Porém, ao chegar ao laboratório de Anatomia Patológica fui surpreendida com a hospitalidade e paciência de todos que lá me ajudaram. Especialmente, agradeço aos residentes Tati e Filipe por terem reservado seu tempo para me ensinar todas as etapas do processo das lâminas, sem medir esforços, e a professora Aline, por ter nos disponibilizado o laboratório e toda a sua equipe e que além da leitura das lâminas, não sabe o quanto me ensinou nas nossas conversas e discussões baseadas nas minhas dúvidas, tanto do projeto quanto na disciplina. Com você professora, tornou-se muito mais simples correlacionar o mundo da patologia com a minha rotina de trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos meus queridos estagiários e alunos da Universidade Paranaense que em mim confiaram e me ajudaram no projeto ao decorrer destes anos. Muito obrigada Júlio Cândido, Filipe e Wellington! Quantas gaiolas carregaram, quanto trabalho eu dei! mas podem ter a certeza que foram o motivo pelo qual eu me dediquei para poder incentivá-los a cada dia e em cada cirurgia. Sei o quanto se desdobraram para poder cumprir com os compromissos comigo assumidos e tenho certeza que os ganhei também como amigos nesta caminhada da vida.

Finalmente, depois de todos os esforços resta a reflexão de que nada disso seria possível se não fosse a oportunidade ofertada pelo programa de mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná. Fica minha gratidão à coordenação da pós graduação e a todos os professores engajados na conquista, manutenção e aprimoramento do programa.

Por último, porém não menos importante, gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof.^a Erica e Prof. Olicies que me acompanharam ao longo destes dois anos e que me tornaram, com certeza, uma melhor profissional ao me guiarem nesta jornada. Muito obrigada por entenderem minhas dificuldades e estarem sempre de prontidão em todos os momentos que precisei. Saibam que serão sempre um exemplo para mim daqui por diante. Gostaria de agradecer particularmente ao Prof. Olicies por ter me ensinado tanta coisa na

ortopedia e por sempre estar acessível para me ajudar nos meus casos clínicos com sua didática impecável e detalhista. Sei que além de ter toda a oportunidade de conviver com um mestre na ortopedia veterinária, ganhei um amigo ao longo deste tempo. Muito obrigada por tudo!

RESUMO

O decanoato de nandrolona é um esteroide anabólico que parece interferir no processo de reparo ósseo por meio dos fatores de crescimento aumentando a osteogênese e inibindo a reabsorção óssea. Este estudo teve por objetivo verificar se o decanoato de nandrolona interfere no tratamento de fraturas e no processo de reparação óssea. Trinta e seis coelhos foram submetidos a um defeito tibial monocortical e tratados conforme o grupo experimental: G1 (n=18) foi o grupo controle e recebeu injeção de NaCl 0,9%; G2 (n=18) foi tratado com decanoato de nandrolona. No 15°, 30° e 45° dias de pós-operatório, seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para que as tíbias fossem avaliadas de forma macro e microscópica. Foram avaliados parâmetros como presença de hematoma, integridade da medula óssea, consolidação do orifício, integridade da cortical, inflamação aguda, necrose, tecido de granulação, tecido conjuntivo fibroso, angiogênese, hiperplasia de periósteo, tecido ósseo neoformado, número de osteoclastos e altura do calo ósseo. Não foi observada diferença estatística entre G1 e G2 nos tempos determinados, porém ao longo do tempo, quando comparados os tempos 15 e 45 e 30 e 45 dias, o decanoato de nandrolona foi capaz de interferir na contagem de osteoclastos e acelerar o processo de reparo ósseo.

Palavras-Chave: calo ósseo, coelhos, fraturas, nandrolona, osteoclastos, reparo ósseo

ABSTRACT

The nandrolone decanoate is an anabolic steroid that seems to interfere in the process of bone repair by growth factors, enhancing osteogenesis and inhibiting bone resorption. This study was realized in order to verify if the nandrolone decanoate interferes with treatment of fractures or with the bone repair process. Thirty-Six rabbits were submitted to a monocortical tibial defect and treated as the experimental group: G1 (n=18) was the control group which received injection of NaCl 0.9 % ; G2 (n=18) was treated with nandrolone decanoate. At 15°, 30° and 45° days post - op, six rabbits of each group were euthanized so the tibias could be macroscopically and microscopically evaluated. Parameters such as: presence of hematoma; bone marrow integrity; consolidation of the perforation; cortical integrity; acute inflammation; necrosis; granulation tissue; fibrous connective tissue; angiogenesis; hyperplasia of the periosteum; the newly formed bone tissue; number of osteoclasts and bone callus height, were evaluated. No statistical difference between G1 and G2 were noticed during the observation period, however, over time, comparisons between 15° and 45° days and between 30° and 45° demonstrates that the nandrolone decanoate was able to interfere with osteoclast count and speed up the bone repair process.

Key words: bone callus, rabbits, fractures, nandrolone, osteoclasts, bone repair.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-DHT - 5 α -Dihidrotestosterona
BMP-2 - Proteína morfogenética 2
BMP-4- Proteína morfogenética 4
BMP-6 - Proteína morfogenética 6
BMP-7- Proteína morfogenética 7
BMPS - proteínas ósseas morfogenéticas
DN - decanoato de nandrolona
FGFs - fator de crescimento de fibroblastos
GH - hormônio do crescimento
GM-CDF - fator de crescimento de fibroblastos
HIF-1 - fator induzido por hipóxia -1
IFN γ – Interferon GAMA
IGF- II - fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
IGF-I - fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL1 - Interleucina 1
IL-11 - Interleucina 11
IL4 - Interleucina 4
IL6- Interleucina 6
IL8 - Interleucina 8
M-CDF – fator de crescimento estimulador de colônia
MMP - metaloproteases da matriz
OPG –osteoprotegerina
PDGFs - fator de crescimento derivado de plaquetas
PG – prostaglandina
PGE1 – Citocina PGE1
PGG – Citocina PGG
PGH2 – Citocina PGH2
PGI2 – Citocina PGI2
PTH - paratormônio
RANK - receptor ativador do fator nuclear-kappa b)
RANKL - ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa b
TGF- β - fator de crescimento transformador beta
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
TRAP - fosfatase ácida tartarato resistente
VEGF - fator de crescimento endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escore (média \pm erro padrão) de inflamação aguda, necrose, tecido de granulação, tecido conjuntivo fibroso, angiogênese, hiperplasia de periósteo e tecido ósseo neoformado observado em coelhos submetidos à falha óssea na tíbia e tratados com NaCl 0,9% ou nandrolona, acompanhados durante 45 dias de pós-operatório	47
Tabela 2 -	Variação (média \pm erro padrão) de número de osteoclastos por campo, altura de calo ósseo em milímetros e relação CTH observada em coelhos submetidos à falha óssea na tíbia não tratados e tratados com decanoato de nandrolona, acompanhados durante 45 dias de pós-operatório	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	O processo de cicatrização óssea é dividido em estágios consecutivos e sobrepostos Fonte: Traduzido e adaptado de Kolar et al. (2010).	19
Figura 2-	Esquema de reabsorção óssea. Enzimas contidas nos lisossomos originados no complexo de Golgi e íons hidrogênio também produzidos pelo osteoclasto são transferidos para o microambiente fechado pela zona circunferencial clara, onde atuam confiando do restante do tecido. A acidificação facilita a dissolução dos minerais e fornece o pH ideal para a ação das enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Assim a matriz é removida e capturada pelo citoplasma dos osteoclastos, onde possivelmente a digestão continua, sendo seus produtos transferidos para os capilares sanguíneos. Fonte: (Junqueira & Carneiro, 2008).	23
Figura 3-	A cascata de cicatrização da fratura. Números 1-7 marcam os pontos sugeridos para intervenção. As setas vermelhas demonstram os prováveis locais de atuação do decanoato de nandrolona. Fonte: adaptado e traduzido de Rozen et al. (2007)	28
Figura 4 –	Realização de falha óssea experimental em tibia de coelho. A - palpação da tuberosidade da tibia como referência anatômica para incisão. B - incisão da pele. C - incisão do periósteo. D - elevação do periósteo com afastador de Molt. E -perfuração tibial. F – aspecto final da sutura cutânea.	34
Figura 5–	Instrumental ortopédico utilizado na indução de falha óssea na tibia de coelhos. A - perfuratriz cirúrgica. B - brocas 2.0 mm e 2.8mm utilizadas na perfuração com dispositivos cirúrgico de parada vertical “stop” (seta amarela).	35
Figura 6 -	Exame radiográfico da tibia de coelhos evidenciando o defeito ósseo circular produzido imediatamente acima da crista da tibia e no centro da metáfise tibial (seta amarela). A – projeção médio-lateral. B – projeção craniocaudal.	35
Figura 7 –	Processamento das tibias de coelhos. A - tibias inteiras após fixação em formol a 10%. B - segmento tibial de aproximadamente 2 cm após secção com serra oscilatória. C - amostra tibial suspensa em EDTA para descalcificação.	37
Figura 8 -	Segmentos de tibia de coelho. A -disposição dos espécimes para exame radiográfico. B – exame radiográfico dos espécimes antes da descalcificação com EDTA. C – exame radiográfico das amostras descalcificadas após quatro semanas com diminuição da radiopacidade.	37
Figura 09-	Espécime de tibia de coelho seccionada no sentido longitudinal. Seta vermelha demonstra a região do orifício/calco ósseo.	38
Figura 10–	Ficha de avaliação macroscópica dos espécimes de tibia de coelho.	38
Figura 11-	Esquema representativo da contagem de osteoclastos. A - cortical óssea. B - calo ósseo, dividido em seis frações: 1 (cortical interna esquerda), 2 (cortical interna direita), 3 (região central do calo ósseo esquerda), 4 (região central do calo ósseo direita), 5 (cortical externa esquerda) e 6 (cortical externa direita).	40

Figura 12 –	Corte histológico de tíbia de coelhos com calo ósseo de 45 dias, evidenciando osteoclastos (seta amarela), em aumento de 40 vezes.	40
Figura 13-	Esquema representativo da obtenção da altura do calo ósseo de tíbia de coelhos. A - cortical óssea. B - calo ósseo, cuja altura foi determinada a partir da média entre B1, B2 e B3.	41
Figura 14-	Mensuração do calo ósseo de tíbia de coelhos utilizando-se o software Image-Pro plus®. As linhas amarelas verticais representam três pontos distintos para cálculo da média da altura do calo ósseo.....	41
Figura 15 –	Calo ósseo observado após 15 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com NaCl 0,9%. A. – tecido de granulação, angiogênese e fibroplasia (setas amarelas) B – Trabéculas óssea com osteoclasto (seta amarela) alojado na lacunas de Howship (setas azuis) indicando remodelação óssea.	45
Figura 16-	Calo ósseo observado após 15 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com nandrolona. Nota-se intensa deposição de tecido conjuntivo fibroso (tCF) e trabéculas ósseas pobremente mineralizadas (seta).	45
Figura 17-	Calo ósseo observado após 30 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com NaCl 0,9%. Nota-se tecido ósseo compacto e denso (1) em meio a ilhas de cartilagem e matriz não mineralizada (elipses).	46
Figura 18-	Calo ósseo observado após 30 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com nandrolona. A - intensa neoformação óssea (seta amarela) estendendo-se desde o perióstio (1) até o canal medular (2) composta por trabéculas ósseas jovens, irregulares e pobremente coradas. B - ilhas multifocais de cartilagem observadas no calo ósseo (seta amarela).	46
Figura 19-	Calo ósseo observado após 45 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com NaCl 0,9% (A) ou nandrolona (B) demonstrando trabéculas ósseas densas (seta amarela) e intenso infiltrado granulocítico (seta azul).	47
Figura 20-	Número de osteoclastos observados em calo ósseo na tíbia de coelhos após 15, 30 e 45 dias de indução experimental de falha óssea e tratados com NaCl 0,9% (controle) ou nandrolona.	48
Figura 21–	Altura de calo ósseo na tíbia de coelhos após 15, 30 e 45 dias de indução experimental de falha óssea e tratados com NaCl 0,9% (controle) ou nandrolona.	49
Figura 22 –	Relação osteoclasto:altura de calo ósseo observados na tíbia de coelhos após 15, 30 e 45 dias de indução experimental de falha óssea e tratados com NaCl 0,9% (controle) ou nandrolona.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Reparo ósseo tecidual	18
2.1.1 Fase Inflamatória	19
2.1.2 Formação do tecido de granulação.....	20
2.1.3 Formação do calo ósseo.....	21
2.1.4 Fase de remodelação	22
2.1.5. reparo ósseo em coelhos.....	25
2.2. Decanoato de nandrolona	26
3. OBJETIVOS	29
4. JUSTIFICATIVA	30
5. HIPÓTESE	31
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
6.1. Certificação Ética.....	32
6.2. Indivíduos	32
6.3. Delineamento Experimental.....	32
6.4. Colheita e preparo das amostras	36
6.5. Avaliação macroscópica	38
6.6. Avaliação microscópica.....	39
6.6.1. Análise descritiva.....	39
6.6.2. Análise semiquantitativa.....	39
6.6.3. Análise quantitativa	39
6.6.3.1. Contagem de osteoclastos.....	39
6.6.3.2. Altura do calo ósseo	40
6.6.3.3. Relação osteoclastos:altura do calo ósseo.....	41
6.7. Análise Estatística.....	42
7. RESULTADOS	43
7.1. Avaliação macroscópica	43
7.2. Avaliação Microscópica.....	43
7.2.1. Análise descritiva.....	43
7.2.2. Avaliação semiquantitativa	47
7.2.3. Análise quantitativa	48
8. DISCUSSÃO	51
9. CONCLUSÕES	56
10. PERSPECTIVAS.....	57
11. REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas representam uma parcela significativa da casuística dos hospitais de animais de companhia e, na grande maioria dos casos, requerem tratamento cirúrgico para reestabelecimento da integridade óssea (LUCAS, et al, 2001; ROZEN et al, 2007; SILVA et al., 2007; ABUD; CAMPOS; BRASIL, 2010).

O processo de reparo do tecido ósseo tem por característica não formar tecido cicatricial e concebe retorno a função do membro acometido por reestabelecer sua anatomia e mecânica óssea originais. Trata-se de um processo complexo que envolve uma série de mecanismos espaciais e temporais coordenados e dependentes de diversos tipos celulares, proteínas, hormônios e fatores de crescimento (GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007; ROZEN et al., 2007).

Embora a regeneração do tecido ósseo seja um processo bem definido, ainda são observadas complicações inerentes ao tratamento de fraturas, como a não união atrófica, não união hipertrófica, má-união e união retardada, capazes de interferir no tempo de recuperação dos pacientes e aumentar as taxas hospitalização inviabilizando o esperado retorno precoce à função (ROZEN et al., 2007; SILVA et al., 2007). Um déficit em quaisquer das etapas do processo de reparo ósseo é capaz de alterar a sequência fisiológica da cascata da consolidação e predispor a complicações. Desta forma, intervenções podem ser necessárias a fim de reverter fatores de interferência e permitir que o reparo da fratura progrida para união adequada e tratamento eficaz (GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007).

O procedimento cirúrgico atrapalha, de certa forma, o processo de reparação inicial fisiológico da fratura, por lesionar o perióstio, o canal medular e destruir o hematoma inicial durante sua execução (CRUESS; DUMONT, 1985). O atraso ou a falha na consolidação óssea é um problema desafiante para o cirurgião (YUN et al., 2005) que instiga a necessidade de pesquisar substâncias que auxiliem na progressão e sucesso da consolidação óssea (YUN ET AL., 2005; GIANNOUDIS; PSARAKIS; KONTAKIS, 2007).

O esteróide decanoato de nandrolona tem sido objeto de estudo como adjuvante no tratamento da osteoporose e no reparo de lesões ósseas podendo ser um agente promissor potencial no tratamento de fraturas (GENNARI et al, 1989; PASSERI et al., 1993; AITHAL et al., 2009; ABEDI et al, 2012; AHMAD, et al 2013). Apesar de seu mecanismo de ação ainda pouco definido, acredita-se que atue na atividade osteoblástica e na expressão de fatores de crescimento promovendo formação óssea mais densa e precoce (KASPERK et al,1997; SARANTEAS et al, 2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPARO ÓSSEO TECIDUAL

O tecido ósseo, principal constituinte do esqueleto responsável pelo suporte e proteção de órgãos, trata-se de um tecido conjuntivo especializado formado por células e matriz óssea extracelular. A parte inorgânica da matriz óssea é representada principalmente pelos íons cálcio e fosfato formando os cristais de hidroxiapatita, e a matriz orgânica apresenta fibras colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas. A associação das fibras de colágeno e cristais confere a característica singular de dureza do tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células que compõe o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos e apresentam funções específicas: os osteoblastos, células mesenquimais, possuem intensa capacidade secretora de matriz orgânica, estão localizados na periferia entre o osso cortical e o periósteo, e produzem fatores de crescimento sob influência do hormônio do crescimento (GH) nos focos de remodelagem; após a síntese de matriz, o osteoblasto permanece aprisionado pela matriz recém sintetizada passando a denominar-se osteócito. Tais osteócitos são células em repouso, instaladas nas criptas ósseas a fim de manter a integridade do tecido, capazes de sintetizar pequena quantidade de matriz e se diferenciarem em osteoblastos e osteoclastos quando estimulados; Ao contrário dos osteoblastos, os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas responsáveis pela lise e reabsorção do tecido ósseo, participando ativamente do processo de reparo tecidual (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MOTTA, 2009).

O processo de reparo é essencial no tratamento de fraturas e visa recuperar a geometria e mecânica do tecido acometido reestabelecendo sua função. Trata-se de um processo complexo e multifatorial que engloba uma série de fatores celulares, hormonais e moleculares e, em condições fisiológicas, tem duração de quatro a seis semanas. Didaticamente podemos dividi-lo em fases inflamatória, formação do tecido de granulação, formação do

calo ósseo e remodelamento ósseo, embora haja sobreposição dos acontecimentos (figura 1) (KOLAR et al., 2010; ROZEN et al., 2007; SCHINDELER, et al, 2008).

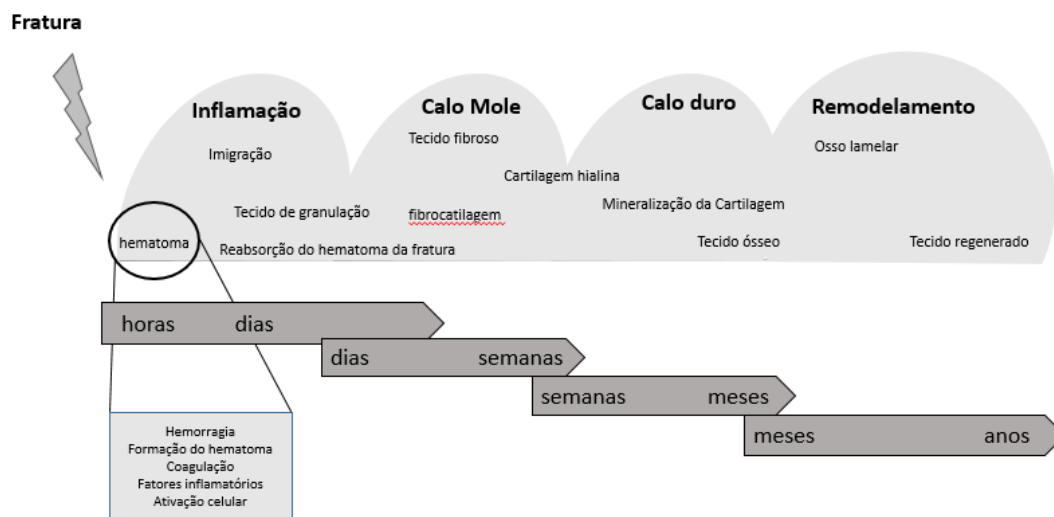


Figura 1: o processo de cicatrização óssea é dividido em estágios consecutivos e sobrepostos Fonte: Traduzido e adaptado de Kolar et al. (2010).

2.1.1 FASE INFLAMATÓRIA

Imediatamente após o trauma ocorre a destruição de matriz, morte celular e lesão de vasos sanguíneos com formação do hematoma local. Como resposta imunológica, as células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos, monócitos e polimorfonucleares, são recrutadas a fim de remover os restos celulares e produzem citocinas (IL1, IL6 e TNF- α), caracterizando o processo inflamatório (KALFAS, 2001; JUNQUEIRA; PHILLIPS, 2005; ROZEN et al., 2007; CARNEIRO, 2008; KUMAR et al, 2008a; KOLAR et AL., 2010).

A contribuição do hematoma local no processo de reparo já é definida e indispensável para que se inicie a cascata de eventos, uma vez que representa um reservatório de fatores de crescimento produzidos por células (p.ex. macrófagos, plaquetas), indispensáveis no processo de angiogênese e

diferenciação celular. O aumento da permeabilidade local e a difusão de proteínas do plasma e fibrina dos capilares recém-formados também são facilitados pelo hematoma (GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007; KOLAR et al., 2010; ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008)

A fase inflamatória inicia-se no momento do trauma e se estende por três dias, dando início a formação do tecido de granulação (ROZEN et al., 2007).

2.1.2 FORMAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO

Marcada por intensa angiogênese e recrutamento das células mesenquimais progenitoras, forma-se um tecido altamente vascularizado e rico em células indiferenciadas, denominado tecido de granulação. Tais células progenitoras provem do periósteo, tecido muscular, osso cortical e medula óssea adjacentes a lesão, conferindo-lhes papel importante no processo de nutrição e reparo (ROZEN et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A formação deste tecido é dependente da ação quimiotática e mitogênica do fator de crescimento (TGF- β) fator de crescimento transformador beta produzido pelas plaquetas e macrófagos presentes no hematoma formado, capaz de direcionar e estimular células mesenquimais, osteoprogenitoras, condroblastos e osteoblastos. Não o bastante, o TGF- β inibe enzimas proteolíticas que poderiam destruir o tecido neoformado e regula a produção de matriz celular orgânica (KALFAS, 2001; ROZEN et al., 2007).

Ambos as citocinas e os fatores de crescimento estimulam a migração de células progenitoras mesenquimais para o local da lesão, e os fatores, de forma geral, induzem a proliferação celular, síntese de matriz, angiogênese e agregação plaquetária. Acredita-se que o TGF- β e as BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas), em conjunto com os fatores PDGFs (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGFs (fator de crescimento de fibroblastos) e IGF- II (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2), atuem diretamente no recrutamento e diferenciação celular das células primitivas. Para o

restabelecimento vascular local os fatores FGFs, VEGF (fator de crescimento endotelial) e HIF-1 (fator induzido por hipóxia -1) influenciam diretamente na angiogênese (PHILLIPS, 2005; ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Esta fase, caracterizada por intensa diferenciação e proliferação de células osteogênicas mediadas pelo TGF- β , sobrepõe a fase inflamatória no terceiro dia do processo e encerra-se aproximadamente no sexto dia do reparo tecidual, totalizando quatro dias de duração (PHILLIPS, 2005; ROZEN et al., 2007)

2.1.3 FORMAÇÃO DO CALO ÓSSEO

Desde o quarto até o décimo quarto dia após o trauma tecidual, o tecido de granulação dá origem aos tecidos cartilagosos e ósseo pela combinação dos processos de ossificação intramembranosa e endocondral. A formação intramembranosa de tecido ósseo independente de cartilagem, já a endocondral depende de células progenitoras para formação de cartilagem e mineralização do calo subsequente. No tratamento da maioria das fraturas a ossificação endocondral é predominante devido ao grau de instabilidade presente no *gap* da fratura (ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Nesta fase, ocorre a formação de um infiltrado rico em fibroblastos adjacente ao periósteo e as células mesenquimais, já recrutadas, se diferenciam em condroblastos capazes de sintetizar matriz cartilaginosa (colágeno tipo II e proteoglicanos), caracterizando o calo mole. O condroblastos se diferenciam em condrócitos maduros e o tecido cartilaginoso hipertrofia conferindo certa estabilidade mecânica até que o calo cartilaginoso seja gradativamente mineralizado (ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

A vascularização se estabelece no foco do calo cartilaginoso e acredita-se que, após promoverem mineralização intersticial, os condrócitos

maduros sofram apoptose e o tecido cartilaginoso é gradativamente removido pelos osteoclastos provenientes do aporte vascular e substituído por matriz óssea neoformada pelos osteoblastos (KALFAS, 2001; ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; SCHINDELER et al., 2008). Tais osteoblastos recém diferenciados também sintetizam uma proteína não colágena denominada osteocalcina, que incorporada à matriz óssea, contribui para o processo de mineralização óssea (SARAIVA, LAZARETTI-CASTRO, 2002).

A diferenciação de células tronco em células osteoprogenitoras é regulada por complexas interações e sinalizações celulares (autócrinas e parácrinas) no sítio local e por estímulos mecânicos externos, mas também pode sofrer influência de hormônios sistêmicos como o paratormônio, 1,5 dihidroxivitamina D, hormônio tireoideano, hormônio do crescimento e esteroides sexuais. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGEF) influencia diretamente na diferenciação de osteoblastos e na mineralização tecidual com conseqüente aumento da produção e cartilagem, reabsorção e formação de tecido ósseo (GIANNOUDIS, 2007; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; KERAMARIS, et al 2008)

2.1.4 FASE DE REMODELAÇÃO

O tecido ósseo recém formado é trabecular e requer substituição por um tecido mais resistente a fim de recuperar a integridade mecânica, anatômica e funcional do osso (ROZEN et al., 2007). O processo de remodelação do osso trabecular em osso lamelar inicia logo após a formação do calo duro (aproximadamente no 14º dia) e perdura por meses, com resistência óssea obtida a partir de três a seis semanas (KALFAS, 2001; ROZEN et al., 2007)

Os osteoclastos são os protagonistas do processo de remodelação por promoverem reabsorção do calo ósseo mineralizado abundante e, em perfeita interação com os osteoblastos, reestruturam o tecido ósseo. A remodelação

inicia-se na borda periosteal do calo duro e ao longo do tempo evolui para a região endosteal reestabelecendo o canal medular (KALFAS, 2001; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; ROZEN et al., 2007)

A sistemática da remodelação óssea compreende quatro etapas: ativação, reabsorção, reversão e formação. O gatilho para a ativação do remodelamento consiste na migração, via hematogena, de células precursoras de osteoclastos responsáveis pela degradação da matriz. Os osteoclastos se aderem junto a matriz celular por meio dos seus prolongamentos citoplasmáticos, criam um ambiente ácido e liberam enzimas lisossomais como a TRAP (fosfatase ácida tartarato resistente) e a MMP (metaloproteases da matriz), capazes de degradar os cristais de hidroxiapatita e colágeno (figura 2). Monócitos e osteócitos liberados pela matriz reabsorvida procedem a etapa de reversão e preenchem as lacunas ósseas deixando um ambiente propício para os osteoblastos direcionados pelos fatores de crescimento liberados pela matriz degradada. Finalmente, os osteoblastos sintetizam nova matriz óssea e regulam sua mineralização, encerrando a formação óssea quando aprisionados na matriz e denominados osteócitos (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SCHINDELER et al., 2008; MONTECINOS; ZENI, 2009).

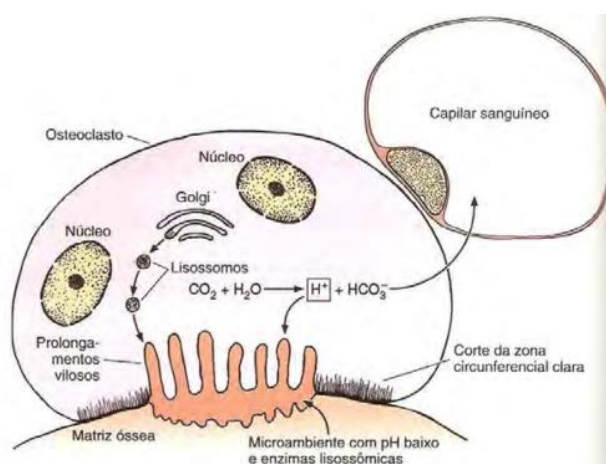


Figura 2- Esquema de reabsorção óssea. Enzimas contidas nos lisossomos originados no complexo de Golgi e íons hidrogênio também produzidos pelo osteoclasto são transferidos para o microambiente fechado pela zona circunferencial clara, onde atuam confiando do restante do tecido. A acidificação facilita a dissolução dos minerais e fornece o pH ideal para a ação das enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Assim a matriz é removida e capturada pelo citoplasma dos osteoclastos, onde possivelmente a digestão continua, sendo seus produtos transferidos para os capilares sanguíneos. Fonte: Junqueira & Carneiro (2008).

Diversos fatores são acusados de gerenciar o remodelamento ósseo e variam desde a estímulos mecânicos impostos ao tecido, nutricionais e genéticos a fatores sistêmicos e locais. O sistema endócrino contribui para a remodelação óssea por intermédio dos hormônio do crescimento (GH), hormônios calcitropicos (PTH, calcitonina e metabólitos de vitamina D) e hormônios esteroides (estrógeno, andrógenos e progesterona). O GH é produzido pela adenohipófise e pelos osteoblastos de forma independente, concebendo atuação local e sistêmica concomitante na atividade osteoblástica. Dentre os fatores locais, destacam-se as citocinas (IL-1, IL-6, IL-11), prostaglandinas, e os fatores de crescimento. Os fatores de crescimento são polipeptídios produzidos pelas próprias células ósseas ou por tecido extra ósseo que modulam o crescimento, diferenciação e proliferação celular com funções particulares e específicas (quadro 01) (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al , 2006; HADJIDAKIS ; ANDROULAKIS, 2006; MONTECINOS; ZENI, 2009; ROZEN et al., 2007; TAKAYANAGI, 2005).)

	Estimulam a formação óssea	Estimulam a reabsorção óssea	Inibem a reabsorção óssea
Fatores de Crescimento	BMP-2, ,BMP-4, BMP-6, BMP-7, IGF-I, IGF-II,TGF- β , FGF, PDGF	TNF,VEGF,PDGF,FGF, M-CDF,GM-CDF	
Citocinas e Hormônios		IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, PGE2, PGE1, PGG, PGI2, PGH2	IFN γ , IL-4

Quadro 01: Fatores locais que regulam a remodelação óssea.

Fonte: Adaptado e Traduzido de Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. (2006)

O mecanismo de interação entre osteoblastos e osteoclastos é determinado sistema RANKL–RANK-OPG. Osteoblastos e células em repouso sintetizam um peptídeo denominado RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa b) que une-se ao seu receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear-kappa b) presente na superfície das células precursoras de osteoclastos, favorecendo sua diferenciação e reabsorção óssea. Como resposta antagonista e na tentativa de impedir reabsorção exacerbada, os osteoblastos sintetizam uma proteína denominada OPG (osteoprotegerina) que

bloqueia a ligação RANKL - RANK, induzindo a apoptose de osteoclastos (TAKAYANAGI, 2005; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; ROZEN ET AL., 2007; MONTECINOS; ZENI, 2009).

2.1.5. REPARO ÓSSEO EM COELHOS

O tecido ósseo nesta espécie também é composto por sistema harvesiano, que se assemelha ao de cães, caprinos e humanos, facilitando a extrapolação de resultados obtidos em pesquisas. O processo de reparo em coelhos, semelhante ao observado nos humanos, é composto por três estágios (MATOS; ARAÚJO; PAIXÃO, 2008).

Na primeira semana, nota-se a presença de um infiltrado celular devido a multiplicação promovida pelas citocinas inflamatórias e infiltração de fibroblastos, associado a presença de tecido ósseo jovem e com discreto tecido lamelar. Na segunda semana, a celularidade se mantém porém a quantidade de tecido ósseo lamelar aumenta progressivamente até que extrapola a quantidade de osso neoformado e alcança a quarta semana do reparo. Nesta semana, a fibrose medular formada é intensa e a celularidade reduz e o processo de reparo conclui –se de quatro a cinco semanas (MATOS; ARAÚJO; PAIXÃO, 2008; ALJUMAILY, 2010).

2.2. DECANOATO DE NANDROLONA

Anabolizantes são substâncias capazes de alterar processos fisiológicos e conseqüentemente a formação de tecidos corpóreos. O potencial da testosterona, hormônio masculino, na formação de tecido muscular é bem definido e notável quando comparamos a musculatura de machos e fêmeas, assimilando o desenvolvimento da musculatura esquelética como dependente de andrógenos (PALERMO-NETO, 2002).

Esteróides anabólicos androgênicos sintéticos análogos da testosterona tem sido objeto de estudo científico e utilizados no tratamento de diversas afecções ósseas, musculares e hematopoiéticas. O decanoato de nandrolona (DN) trata-se de um esteróide com efeito anabólico predominante e baixo potencial androgênico capaz de promover hipertrofia muscular significativa. Inclusive, tal característica anabólica, despertou o uso abusivo e ilegal em atletas associado aos poucos efeitos colaterais, a curto prazo (THIBLIN; PETERSSON, 2005; DUTRA; PAGANI; RAGNINI, 2012).

Desde 1980 já se sugeria a possibilidade do DN aumentar a osteogênese e inibir a reabsorção óssea, contribuindo assim para o aumento da massa óssea (DHEM; ARS-PIRET; WATERSCHOOT, 1980). Kasperk et al. (1989) foram os primeiros pesquisadores a descrever um aumento dose-dependente na proliferação de osteoblastos após tratamento de cultivos celulares *in vitro* com 5-DHT (5 α -Dihidrotestosterona). Sequencialmente, identificaram o potencial mitótico da 5-DHT na proliferação celular em cultivos de osteoblastos por conseqüência do aumento da produção de TGF- β (KASPERK et al., 1997).

Diversas investigações experimentais *in vivo* e *in vitro* vem sendo conduzidas desde então a fim de avaliar a contribuição deste fármaco no processo de reparo ósseo. A capacidade do DN de aumentar a densidade óssea foi verificada em situações de osteopenia e inclusive, é utilizado há tempos no tratamento de mulheres com osteoporose pós menopausa por promover aumento satisfatório da densidade e inibição da reabsorção óssea (GENNARI et al., 1989; PASSERI et al., 1993; AITHAL et al., 2009). Em contrapartida, a associação do DN com suplementação proteica não revelou

incrementos na densitometria óssea de mulheres com osteoporose e fratura de fêmur (TENGGSTRAND et al., 2007).

Além do tratamento da osteoporose estabelecida, o DN é indicado como profilaxia no desenvolvimento desta afecção em situações de desuso do membro por traumas neurológicos (CARDOZO et al., 2010) bem como na prevenção de efeitos deletérios na musculatura esquelética em desuso (FUSATTO, 2010; PARDI, 2010).

A interferência do fármaco na evolução do reparo ósseo é bastante discutida. O aumento na atividade osteoblástica e a melhor mineralização do calo ósseo são os pontos primordiais. Mota et al. (2010) identificaram aumento na tensão máxima de tíbias de ratos, avaliadas por testes biomecânicos e tratados com o decanoato após a lesão induzida e Ahmad et al (2013) complementaram a hipótese quando uma melhor mineralização do calo ósseo foi obtida em exames radiográficos de coelhos osteotomizados e tratados com DN. Adicionalmente neste estudo, a atividade de fosfatase alcalina sérica e a avaliação histopatológica revelaram intensa atividade osteoblástica e formação de tecido ósseo lamelar precoce (AHMAD et al., 2013).

Embora o reparo ósseo seja influenciado por hormônios sexuais e o incremento do DN no sistema músculo esquelético seja notável, o real mecanismo de ação ainda permanece obscuro (CARDOZO et al., 2010; FUSATTO, 2010; MOTA et al., 2010; SCHALCH et al., 2013). Respostas celulares e moleculares parecem estar envolvidas: o aumento da proliferação e adesão de osteoblastos foi verificado em cultivos celulares tratados com DN (SCHALCH et al., 2013); a expressão do fator de crescimento TGF- β e os níveis plasmáticos de IGF-1 foram significativamente aumentados *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (KASPERK et al., 1997; SARANTEAS et al, 2001). O TGF- β é um potente estimulador de formação óssea por promover a diferenciação de células primitivas em osteoblastos, sintetizar matriz e inibir a síntese de proteases que degradam matriz óssea, já o IGF-1, aumenta o número e a função dos osteoblastos estimulando a síntese de colágeno (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006), sugerindo as vias de ação do fármaco no metabolismo ósseo.

O conhecimento da complexa cascata biológica e molecular do reparo ósseo instiga a possibilidade de intervir em diferentes etapas com o intuito de acelerar a regeneração tecidual (ROZEN et al., 2007). Rozen et al. (2007) sugerem alguns momentos específicos onde intervenção exógena seria viável, que varia desde a fase inflamatória até ao remodelamento ósseo final. Uma vez que o DN atua na atividade de osteoblastos e na expressão dos fatores de crescimento TGF- β e IGF-I (KASPERK et al., 1997; SARANTEAS et al., 2001; SCHALCH et al., 2013), a sua atuação na dinâmica da cascata reflete diretamente nas fases de reparo (figura 3).

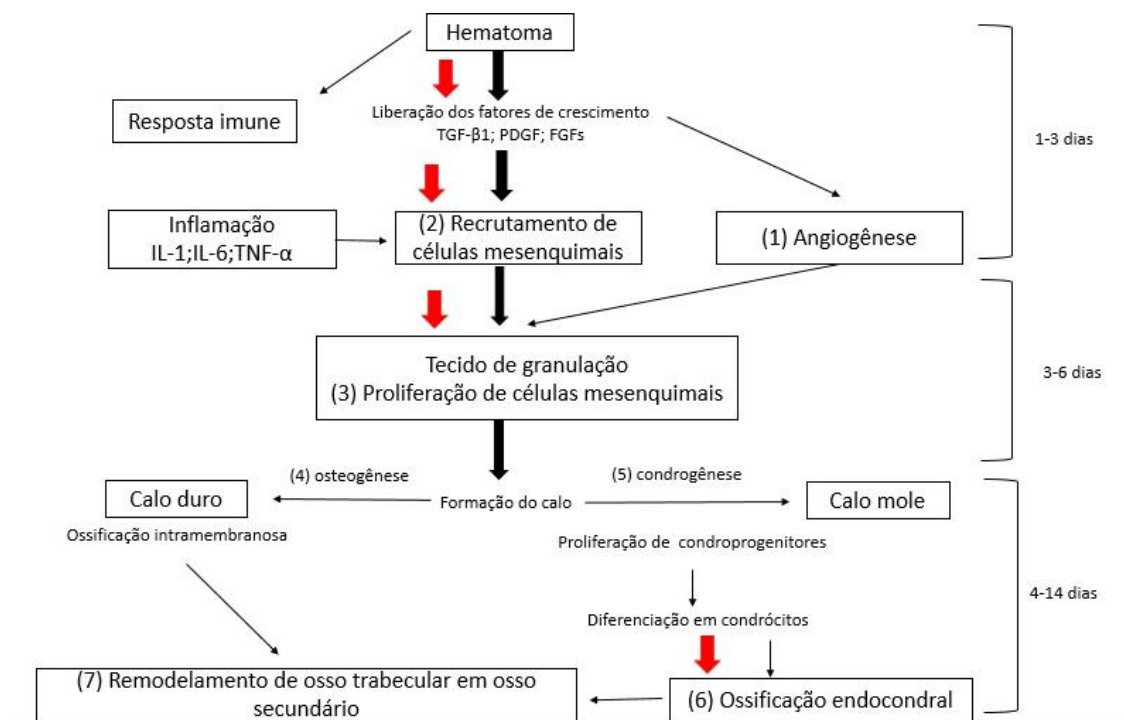


Figura 3 - A cascata de cicatrização da fratura. Números 1-7 marcam os pontos sugeridos para intervenção. As setas vermelhas demonstram os prováveis locais de atuação do decanoato de nandrolona.

Fonte: adaptado e traduzido de Rozen et al. (2007)

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a interferência do decanoato de nandrolona no processo de reparo ósseo, a fim de sustentar sua utilização como um recurso terapêutico adicional no tratamento de fraturas.

Objetivos Específicos

- Verificar o efeito macroscópico da ação do decanoato de nandrolona
- Verificar o efeito microscópico do decanoato de nandrolona por meio da avaliação da morfologia tecidual do calo ósseo;
- Verificar o efeito microscópico do decanoato de nandrolona por meio da avaliação da presença e característica de inflamação, granulação, fibroplasia, angiogênese, periósteo e neoformação óssea;
- Verificar o efeito microscópico do decanoato de nandrolona por meio da contagem de osteoclastos;
- Verificar o efeito microscópico do decanoato de nandrolona por meio da mensuração da altura do calo ósseo.

4. JUSTIFICATIVA

A traumatologia representa uma área frequente da ortopedia de animais de companhia e, concomitante à sua alta casuística, estão relacionadas complicações ao longo do tratamento das fraturas.

Na tentativa de contribuir para o sucesso da reparação tecidual óssea e reduzir as taxas de insucesso no tratamento de fraturas dos animais de companhia, pretendeu-se avaliar qual a contribuição do decanoato de nandrolona na osteogênese e na consolidação de falhas ósseas.

Uma vez identificado o papel deste fármaco na regeneração tecidual óssea valida-se a sua utilização como recurso adicional no tratamento e consolidação de fraturas a fim de promover a redução do tempo de recuperação da função do membro acometido.

5. HIPÓTESE

O decanoato de nandrolona interfere no processo de reparo ósseo tecidual reduzindo o tempo de consolidação óssea.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. CERTIFICAÇÃO ÉTICA

Este projeto foi analisado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Palotina) e foi aprovado sob o protocolo nº33/2013.

6.2. INDIVÍDUOS

Foram utilizados 36 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, machos, com cerca de seis meses de idade e peso $3,5 \pm DP 0,5$ Kg, oriundos do biotério da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram transportados em gaiolas próprias sob condições controladas de temperatura e acomodados nas instalações do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina, em área exclusiva, com gaiolas individuais (dimensões 40X60X40) e dieta livre com ração balanceada para a espécie, por um período de adaptação de 15 dias

6.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 36 coelhos foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a confecção de um defeito ósseo em tíbias direita esquerda e divididos aleatoriamente em dois grupo experimentais: controle e tratamento. O grupo G1 (n=18) foi tratado com injeção intramuscular de NaCl 0,9% em volume equivalente ao calculado em G2. Os animais de G2 (n=18) receberam 10 mg/Kg de decanoato de nandrolona¹, por via intramuscular. As injeções foram

¹ Deca-durabolin® 50ng/ml – Organon – São Paulo – SP – BR

realizadas imediatamente ao procedimento cirúrgico, e no 7 °, 14° e 21°, 28°, 36°, 44° dias de pós-operatório.

Antes do procedimento anestésico, todos os animais foram submetidos à pesagem, exame clínico e hemograma pré-operatório. Foi realizada medicação pré-anestésica com cloridrato de cetamina (20mg/Kg)², midazolam³ (1mg/kg) e sulfato de morfina⁴ (2mg/kg) via intramuscular seguida de tricotomia ampla e cuidadosa dos membros pélvicos e região sacrococcígea com máquina e lâmina de tosa de número 40 finalizada com creme depilatório a base de uréia:

O acesso venoso foi realizado na veia auricular para administração de fluidoterapia transoperatória com solução de Ringer Lactato (figura 04). Utilizou-se cefalotina⁵ na dose de 15 mg/ Kg por via intravenosa, aplicado 10 minutos antes da incisão cirúrgica cefalotina como antimicrobiano profilático.

Na sala de cirurgia os animais foram induzidos e mantidos em plano anestésico com vaporização de isofluorano⁶ via máscara (fluxo de oxigênio de 1-2 litros por minutos e concentração volátil estimada de 1,7 – 2,5%), por se tratar de um procedimento inferior a 20 minutos e realizada a anestesia epidural sacrococcígea com lidocaína⁷ (0,3 ml/Kg) para analgesia dos membros pélvicos (GREENAWAY et al, 2001). A monitorização transoperatória ocorreu por meio de avaliação dos parâmetros vitais e controle de plano anestésico observado pela resposta ao pinçamento, reflexos palpebrais e corneais.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal com os membros estendidos para a realização da antissepsia cirúrgica prévia com iodopovidona em solução degermante a 1% seguida de álcool 70% e iodopovidona em solução tópica a 1% e a região distal à tíbia foi envolta com ataduras estéreis.

A técnica cirúrgica constituiu-se de uma incisão de pele longitudinal com cerca de 1 cm na face medial da tíbia imediatamente proximal ao término da crista tibial, seguida de incisão e afastamento do periósteo e perfuração

² Cetamin® 10% – Syntec- Cotia – SP- BR

³ Dormire® 15mg/3ml – Cristália – Itapira – SP - BR

⁴ Dimorf® 10mg/ml - Cristália – Itapira – SP - BR

⁵ Keflin® 1g – ABL – Cosmópolis – SP - BR

⁶ Isoforine® 1ml/ml - Cristália – Itapira – SP - BR

óssea. Para a perfuração do orifício monocortical foram utilizadas duas brocas cilíndricas acopladas a perfuratriz cirúrgica de baixa rotação, com 3 mm de profundidade controladas por meio de um dispositivo cirúrgico de parada vertical “stop”. A perfuração inicial foi realizada com a broca cilíndrica de diâmetro 2.0 mm e finalizada com a broca de 2.8mm, a fim de evitar fraturas iatrogênicas, sendo que as brocas possuem um limitador de cortical (Figuras 4, 5 e 6).

Para síntese, foi realizada sutura do periósteo e subcutâneo com fio absorvível sintético multifilamento (poliglactina 910, n° 4-0)⁸ por meio dos padrões Sultan e Cushing respectivamente. Na pele foi utilizado fio não absorvível sintético monofilamento (mononylon 4.0)⁹ e padrão simples separado.



Figura 4 – Realização de falha óssea experimental em tibia de coelho. A - palpção da tuberosidade da tibia como referência anatômica para incisão. B - incisão da pele. C - incisão do periósteo. D - elevação do periósteo com afastador de Molt. E - perfuração tibial. F – aspecto final da sutura cutânea.

⁷ Lidovet® 2% - BRAVET – Engenho Novo – RJ - BR

⁸ Vicpoint® - Point Suture – Fortaleza – CE - BR

⁹ Nylon - Shalon® - Goiânia – GO - BR

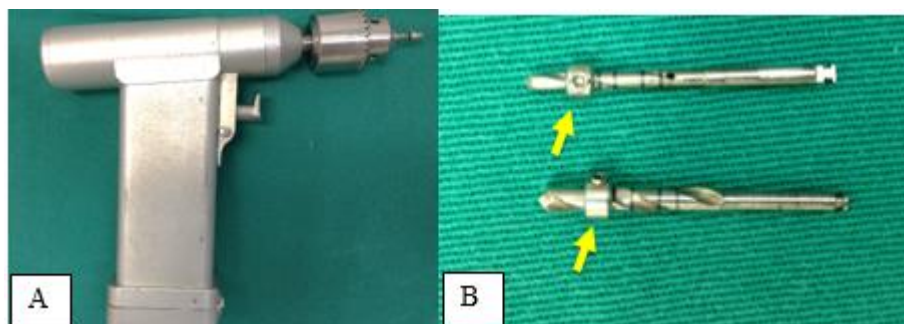


Figura 5– Instrumental ortopédico utilizado na indução de falha óssea na tíbia de coelhos. A - perfuratriz cirúrgica. B - brocas 2.0 mm e 2.8mm utilizadas na perfuração com dispositivos cirúrgico de parada vertical “stop” (seta amarela).



Figura 6 - Exame radiográfico da tíbia de coelhos evidenciando o defeito ósseo circular produzido imediatamente acima da crista da tíbia e no centro da metáfise tibial (seta amarela). A – projeção médio-lateral. B – projeção craniocaudal.

Os pacientes foram observados até a recuperação anestésica e receberam no período pós-operatório analgesia com 0,2 mg/Kg de meloxicam¹⁰, a cada 24 horas, por 5 dias e sulfato de morfina⁴ na dosagem de 2,5mg/Kg, a cada 12 horas, por 3 dias, além de todos os cuidados diários inerentes à ferida cirúrgica, estado geral, nível de atividade e comportamento.

¹⁰ Maxicam® 0,2% - Ourofino – Cravinhos – SP - BR

6.4. COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS

No 15º, 30º e 45º dia de pós-operatório, seis coelhos de cada grupo experimental foram submetidos à eutanásia de acordo com a Resolução nº1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária para que se procedesse a colheita de amostras a partir da tíbia dos animais.

Para a eutanásia, os animais receberam medicação pré-anestésica com cloridrato de cetamina² (20mg/Kg) e midazolam³ (1mg/kg), seguida de indução com propofol¹¹ (3-mg/kg) até atingirem plano anestésico e injeção letal com cloreto de potássio¹².

As amostras foram obtidas por meio de desarticulação fêmuro-tíbio-patelar e tíbio-társica e remoção da pele e camadas musculares de forma a não prejudicar a região próxima à falha óssea experimentalmente induzida. As tíbias foram fixadas em solução de formol 10% por 48 horas, e seccionadas com o auxílio de serra oscilatória, a fim de se obter espécimes menores para descalcificação.

O corte foi realizado 1 cm proximal e distal ao orifício, restando um segmento ósseo com aproximadamente 2 cm. Para a descalcificação em etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 8%, as amostras foram acondicionadas em recipiente plástico de forma suspensa e a solução trocada a cada sete dias até completa descalcificação, verificada por exame radiográfico, em torno de 4 a 5 semanas (figuras 07 e 08).

¹¹ Propovan® 10mg/ml - Cristália – Itapira – SP - BR

¹² Cloreto de Potássio 10% - Hypofarma –Ribeirão das neves – MG -BR



Figura 7– Processamento das tíbias de coelhos. A - tíbias inteiras após fixação em formol a 10%. B - segmento tibial de aproximadamente 2 cm após secção com serra oscilatória. C - amostra tibial suspensa em EDTA para descalcificação.

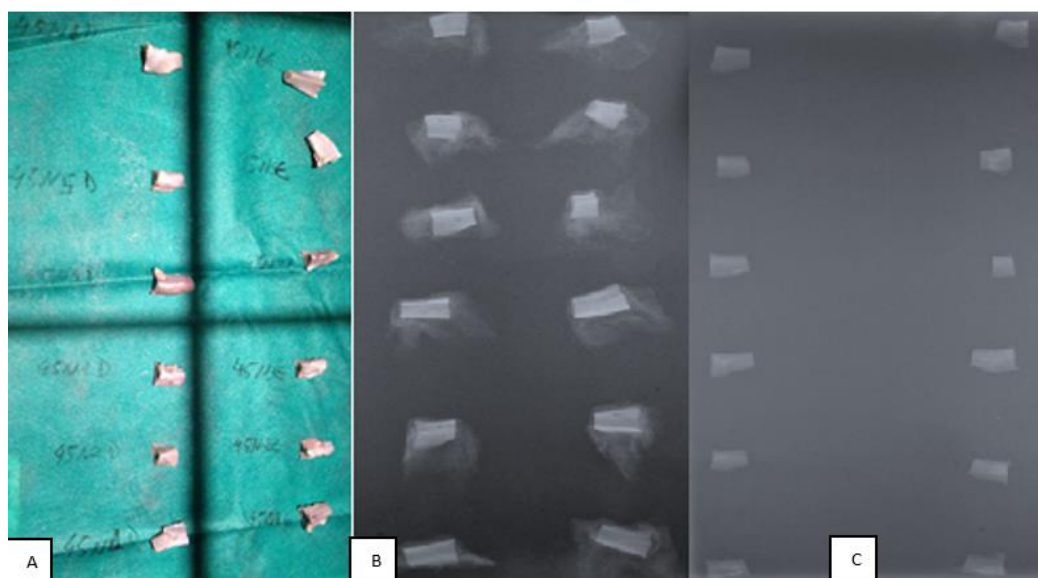


Figura 8: Segmentos de tíbia de coelho. A -disposição dos espécimes para exame radiográfico. B – exame radiográfico dos espécimes antes da descalcificação com EDTA. C – exame radiográfico das amostras descalcificadas após quatro semanas com diminuição da radiopacidade.

6.5. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

As amostras de tíbia foram cortadas com lâmina de micrótomo no sentido longitudinal, de forma a dividir os orifícios, criando dois espectrais e aumentando o número de amostras. Ambos os segmentos foram submetidos à avaliação macroscópica (figura 09).

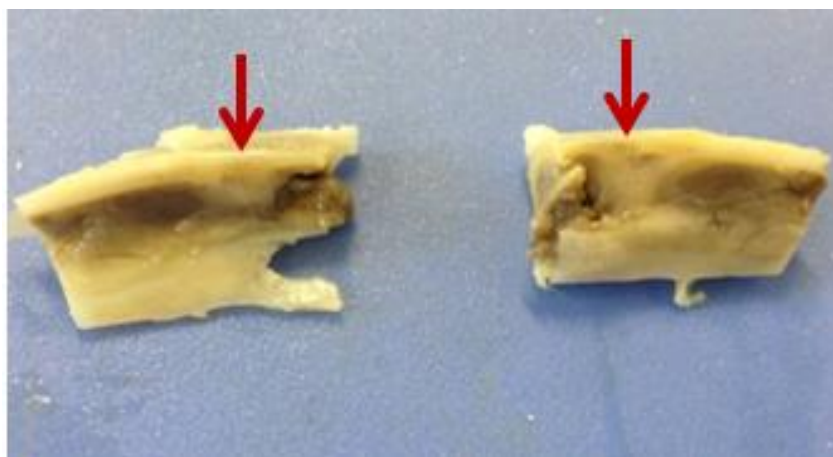


Figura 9- Espécime de tíbia de coelho seccionada no sentido longitudinal. Seta vermelha demonstra a região do orifício/caló ósseo.

Fonte: Arquivo pessoal, 2014

Para a avaliação macroscópica houve classificação em escores quanto à presença de hematoma, integridade da medula óssea, consolidação do orifício e integridade da cortical de acordo com a figura 10.

Espécime	Avaliação
Hematoma	Grande () Médio () Pequeno () Nenhum ()
Integridade da Medula óssea	Sim () Não ()
Consolidação do orifício	100% () 75% () 50% () 25% () 0% ()
Integridade da cortical	Interna: sim () não () Externa: sim () não ()

Figura 10– Ficha de avaliação macroscópica dos espécimes de tíbia de coelho.

Fonte: Adaptado de CUNHA, 2012

6.6. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

As amostras foram embebidas em parafina, cortadas em secção de 5µm e os cortes foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (Luna, 1968), obtendo-se duas lâminas de cada animal.

6.6.1. ANÁLISE DESCRITIVA

As características do defeito ósseo, presença de tecido de granulação, neoformação vascular, áreas de matriz óssea e/ou cartilaginosa foram descritas morfológicamente considerando uma lâmina de cada tempo experimental.

6.6.2. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA

Ambas a lâminas de cada animal foram avaliadas segundo os critérios de inflamação aguda, necrose, tecido de granulação, tecido conjuntivo fibroso, angiogênese, hiperplasia de periósteo e tecido ósseo neoformado. Tais parâmetros foram classificados em escores, seguindo os critérios do Instituto de Forças Armadas de Patologia (AFIP): 0 – ausente; 1 – leve (< 30%); 2 – moderado (30-70%); 3 – acentuado (70-95%); 4 – severo (>95%). A partir destes valores, obteve-se a média por animal de cada critério estabelecido.

6.6.3. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.6.3.1. CONTAGEM DE OSTEOCLASTOS

Para a avaliação quantitativa foi realizada a contagem de osteoclastos na região do calo ósseo, obtendo-se a média final de seis campos aleatórios, capturados por microscopia (Leica DM 1000 ®) no aumento de 40 vezes para determinação da média por animal (Figuras 11 e 12).

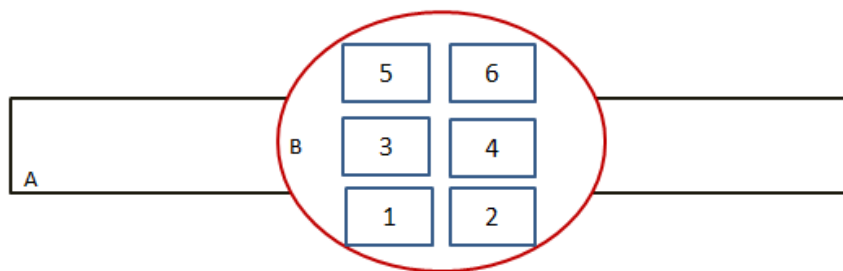


Figura 11- Esquema representativo da contagem de osteoclastos. A - cortical óssea. B - calo ósseo, dividido em seis frações: 1 (cortical interna esquerda), 2 (cortical interna direita), 3 (região central do calo ósseo esquerda), 4 (região central do calo ósseo direita), 5 (cortical externa esquerda) e 6 (cortical externa direita).

Fonte: Arquivo pessoal, 2014

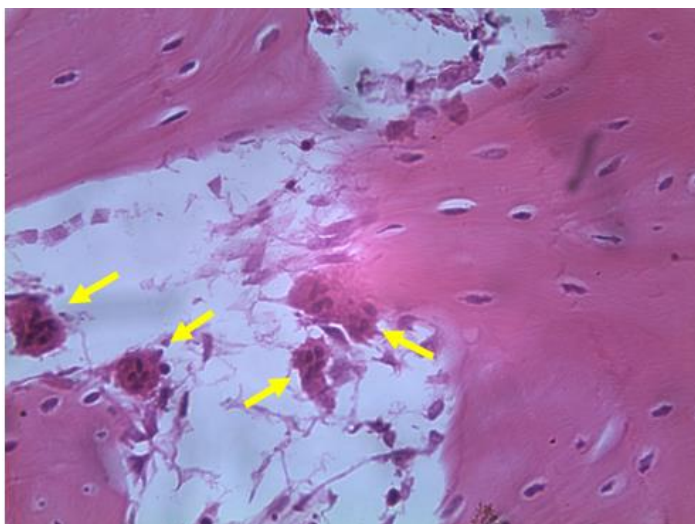


Figura 12- Corte histológico de tibia de coelhos com calo ósseo de 45 dias, evidenciando osteoclastos (seta amarela), em aumento de 40 vezes.

Fonte: Arquivo pessoal, 2014

6.6.3.2. ALTURA DO CALO ÓSSEO

A altura do calo ósseo abrangendo a matriz óssea e cartilaginosa foi determinada por meio da média de três medidas aleatórias na região do calo (Figuras 13). Para tanto, foram capturadas imagens do calo ósseo por meio de microscopia (software Leica Application Suite 3.8.0 - Leica DM 1000 ®) em

aumento de quatro vezes e com auxílio do analisador de imagens Image Pro-plus® (Figura 14).

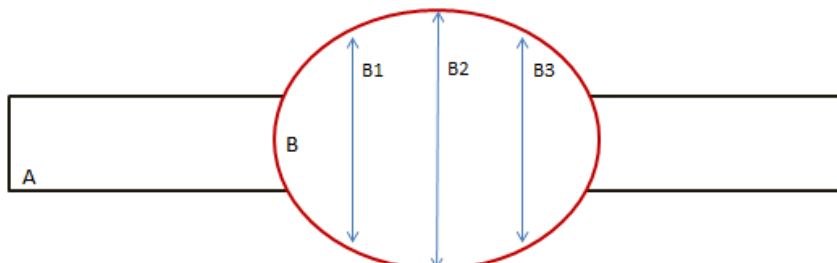


Figura 13- Esquema representativo da obtenção da altura do calo ósseo de tíbia de coelhos. A - cortical óssea. B - calo ósseo, cuja altura foi determinada a partir da média entre B1, B2 e B3. Fonte: Arquivo pessoal, 2014

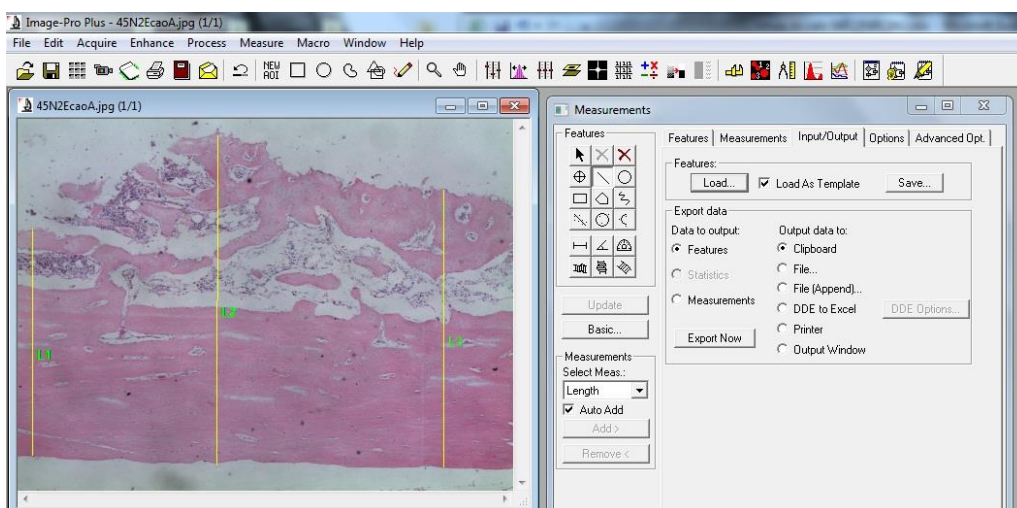


Figura 14- Mensuração do calo ósseo de tíbia de coelhos utilizando-se o software Image-Pro plus®. As linhas amarelas verticais representam três pontos distintos para cálculo da média da altura do calo ósseo. Fonte: Arquivo pessoal, 2014

6.6.3.3. RELAÇÃO OSTEOCLASTOS:ALTURA DO CALO ÓSSEO

A relação osteoclastos:altura do calo ósseo (RCH) foi expressa pela quantidade de osteoclastos por milímetros de calo ósseo. Essa relação foi determinada para cada animal, em porcentagem, por meio da fórmula: $RCH (\%) = (C / H) \times 100$, onde C é osteoclasto e H é altura.

6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as variáveis, foram comparados os resultados de G1 e G2 no 15°, 30° e 45° dia de pós-operatório. Também foram comparados os resultados ao longo do tempo em cada um dos grupos.

Os parâmetros semiquantitativos, como inflamação aguda, necrose, tecido de granulação, tecido conjuntivo fibroso, angiogênese, hiperplasia de periósteo e tecido ósseo neoformado, foram submetidos a avaliação não paramétrica utilizando o teste de Kruskal Wallis seguido por Tukey ($p < 0,05$), para avaliação ao longo do tempo, e ao teste de Mann Whiney ($p < 0,05$), para comparação entre os grupos.

A contagem de osteoclastos, altura do calo e a relação dos osteoclastos com a altura do calo foram avaliados de forma paramétrica através o teste T ($p < 0,05$), para a comparação entre os grupos, e pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), para avaliação ao longo do tempo.

7. RESULTADOS

7.1. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Aos 15 dias de pós-operatório, um animal de cada grupo apresentou consolidação de 75% da falha óssea, visto que a cortical externa não estava totalmente consolidada. Os demais coelhos apresentaram consolidação completa do defeito ósseo incluindo ambas as corticais interna e externa. A presença de pequeno hematoma foi identificada em apenas um exemplar do grupo nandrolona. A medula óssea de todos os animais estava íntegra.

No 30° dia de pós-operatório, todas os espécimes apresentaram ausência de hematoma local, medula óssea íntegra e consolidação total do orifício em ambas as corticais interna e externa. Não se observou diferença entre os grupos controle e nandrolona.

Aos 45° dias de pós-operatório não se verificou presença de hematoma e nem perda da integridade medular, porém quatro animais do grupo controle e cinco animais do grupo nandrolona apresentaram apenas 75% de consolidação do orifício devido a não integridade da cortical interna.

7.2. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

7.2.1. ANÁLISE DESCRITIVA

Aos 15 dias de pós-cirúrgico, no grupo controle, verificou-se uma área focal com intensa formação de tecido de granulação, fibroplasia, angiogênese moderada e intensa proliferação de osteoblastos envoltos por matriz óssea moderada que por vezes apresentavam mineralização intensa (osteogênese). O osso neoformado se projetava em direção ao perióstio formando trabéculas multifocais a coalescentes acentuadas e algumas envoltas por um moderado infiltrado de osteoclastos alojados em lacunas de Howship indicando remodelação óssea (figura 15).

No grupo tratado com nandrolona, com 15 dias, ocorreu intensa deposição de tecido conjuntivo fibroso no perióstio com grande quantidade de

fibroblastos e colágeno imaturo. A proliferação de tecido de granulação e angiogênese foram focais e moderadas. No tecido ósseo havia intensa osteogênese com formação de trabéculas irregulares e pobremente mineralizadas, com a presença de osteoclastos aleatórios em múltiplos focos e deposição de matriz óssea discreta (figura 16).

Aos 30 dias, no grupo controle, notou-se foco intenso de tecido de granulação sobre o periósteo acompanhado de angiogênese e fibroplasia de leve à moderada. O tecido ósseo adjacente a essa área apresentava-se compacto e denso, porém ainda com ilhas de cartilagem não mineralizada ao centro e osteoclastos distribuídos de forma focal em quantidade moderada (figura 17). No grupo que recebeu nandrolona, observou-se uma área focal com intensa neoformação óssea estendendo-se desde o periósteo até o canal medular composta por trabéculas ósseas jovens, irregulares e pobremente coradas. Próximo ao periósteo foram observadas ilhas multifocais de cartilagem (figura 18).

Na avaliação aos 45 dias observou-se, em ambos os grupos, a presença de acentuada fibroplasia focal do periósteo com neoformação óssea e trabéculas densas com raros focos de matriz óssea não mineralizada. A angiogênese encontrava-se adjacente ao tecido ósseo neoformado. Notou-se osteoclasia e macrófagos em alguns segmentos próximos à medula com intenso infiltrado de granulócitos acompanhado de lise de algumas trabéculas (figura 19).

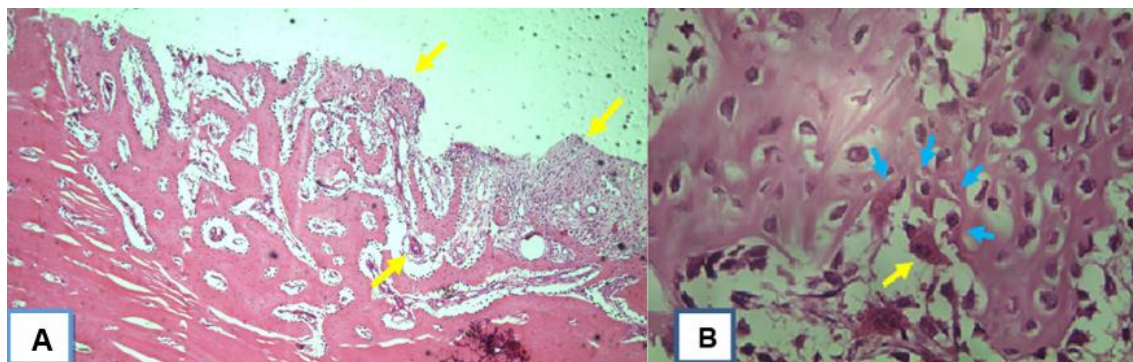


Figura 15– Calo ósseo observado após 15 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com NaCl 0,9%. A. – tecido de granulação, angiogênese e fibroplasia (setas amarelas) B – Trabéculas óssea com osteoclasto (seta amarela) alojado na lacunas de Howship (setas azuis) indicando remodelação óssea.

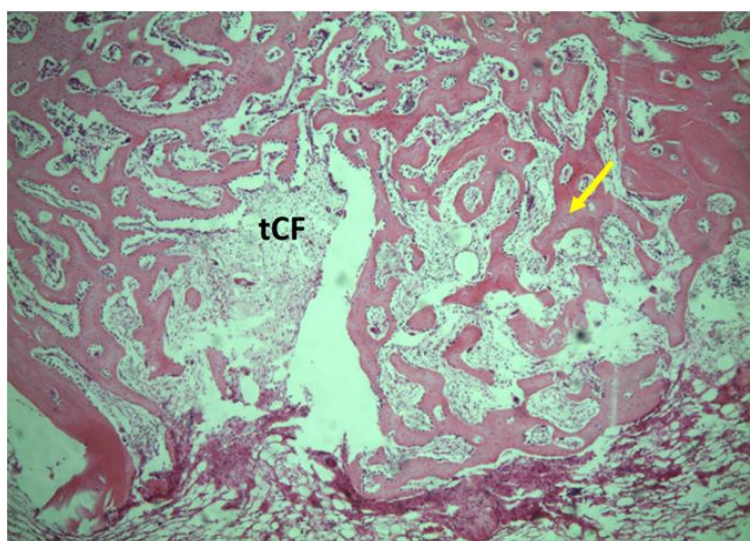


Figura 16- Calo ósseo observado após 15 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com nandrolona. Nota-se intensa deposição de tecido conjuntivo fibroso (tCF) e trabéculas ósseas pobremente mineralizadas (seta).

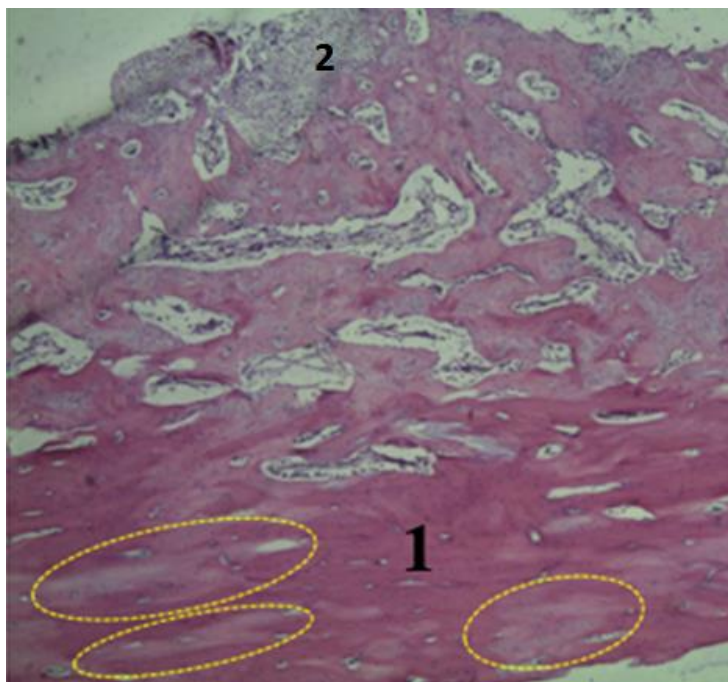


Figura 17- Calo ósseo observado após 30 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com NaCl 0,9%. Nota-se tecido ósseo compacto e denso (1) em meio a ilhas de cartilagem e matriz não mineralizada (elipses) e tecido de granulação com angiogênese sobre o periósteo (2)

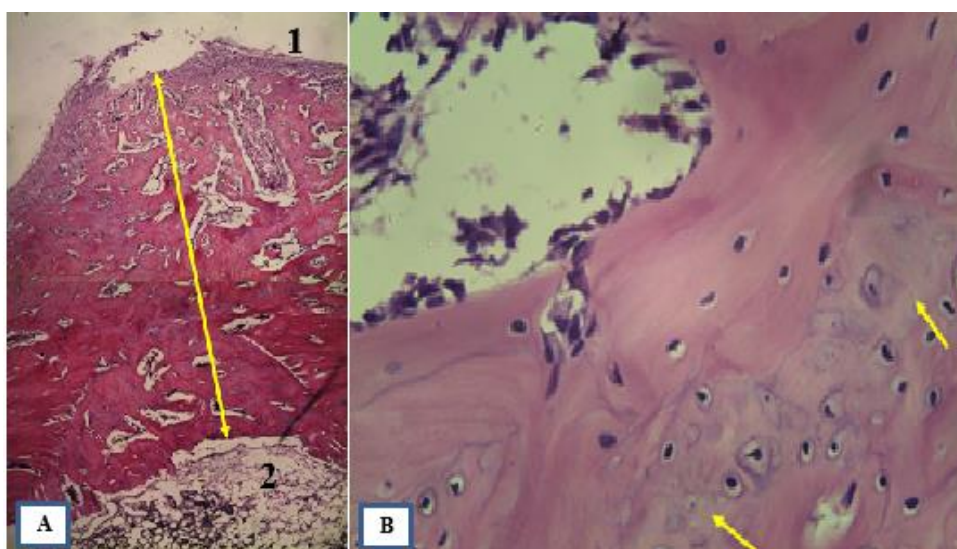


Figura 18- Calo ósseo observado após 30 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com nandrolona. A - intensa neoformação óssea (seta amarela) estendendo-se desde o periósteo (1) até o canal medular (2) composta por trabéculas ósseas jovens, irregulares e pobremente coradas. B - ilhas multifocais de cartilagem observadas no calo ósseo (seta amarela).

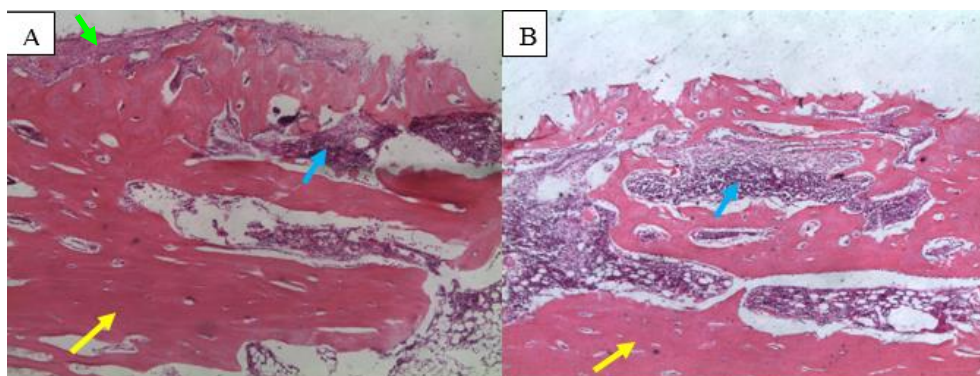


Figura 19- Calo ósseo observado após 45 dias de indução experimental de falha óssea tibial em coelhos tratados com NaCl 0,9% (A) ou nandrolona (B) demonstrando fibroplasia do periósteo (seta verde), trabéculas ósseas densas (seta amarela) e intenso infiltrado granulocítico (seta azul).

7.2.2. AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Ao se comparar os grupos, não houve diferença estatística na avaliação dos dados não paramétricos. Todavia, na avaliação ao longo do tempo, os animais do grupo nandrolona demonstraram menor processo inflamatório aos 30 dias em relação aos 15 dias de pós-operatório (tabela 1).

Tabela 1 - Escore (média \pm erro padrão) de inflamação aguda, necrose, tecido de granulação, tecido conjuntivo fibroso, angiogênese, hiperplasia de periósteo e tecido ósseo neoformado observado em coelhos submetidos à falha óssea na tíbia e tratados com NaCl 0,9% ou nandrolona, acompanhados durante 45 dias de pós-operatório.

	Controle			Nandrolona		
	D15	D30	D45	D15	D30	D45
Inflamação aguda	0,17 \pm 0,11	0,50 \pm 0,26	0,33 \pm 0,17	0,50 \pm 0,18#	0,00 \pm 0,00	0,25 \pm 0,11
Necrose	0,17 \pm 0,11	0,25 \pm 0,17	0,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,17	0,08 \pm 0,08	0,08 \pm 0,08
Tecido de granulação	1,17 \pm 0,31	0,42 \pm 0,27	1,33 \pm 0,38	1,92 \pm 0,55	0,42 \pm 0,15	0,92 \pm 0,44
Tecido conjuntivo fibroso	1,75 \pm 0,17	1,58 \pm 0,24	1,83 \pm 0,28	2,33 \pm 0,49	1,25 \pm 0,28	1,58 \pm 0,33
Angiogênese	1,17 \pm 0,21	1,08 \pm 0,40	1,00 \pm 0,18	1,67 \pm 0,48	0,42 \pm 0,15	0,75 \pm 0,42
Hiperplasia de periósteo	2,08 \pm 0,40	1,42 \pm 0,35	2,42 \pm 0,27	2,25 \pm 0,42	1,42 \pm 0,30	2,00 \pm 0,41
Tecido ósseo neoformado	2,08 \pm 0,30	2,33 \pm 0,33	2,50 \pm 0,18	2,67 \pm 0,40	1,75 \pm 0,36	2,08 \pm 0,24

diferente de D30

7.2.3. ANÁLISE QUANTITATIVA

Na comparação entre os grupos controle ou nandrolona, não houve diferença significativa com relação ao número de osteoclastos (Figura 20), altura do calo (Figura 21) e na relação osteoclastos:altura do calo (Figura 22).

A contagem de osteoclastos no grupo tratado com nandrolona foi significativamente reduzida ao longo do tempo, apresentando diferença estatística entre 15 e 45 dias e entre 30 e 45 dias de pós-operatório. Por consequência, a relação de osteoclastos:altura do calo, no grupo nandrolona, também foi menor (tabela 2).

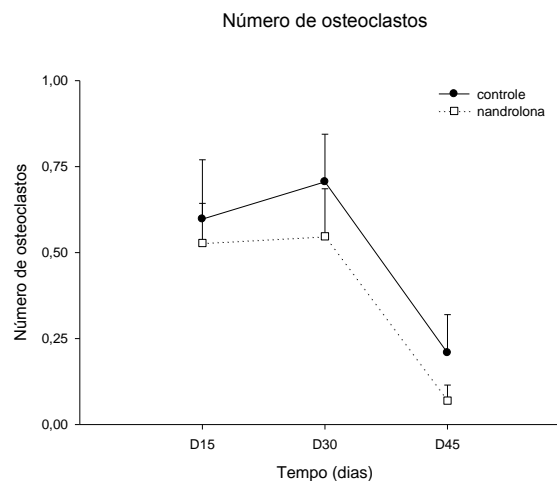


Figura 20- Número de osteoclastos observados em calo ósseo na tíbia de coelhos após 15, 30 e 45 dias de indução experimental de falha óssea e tratados com NaCl 0,9% (controle) ou nandrolona.

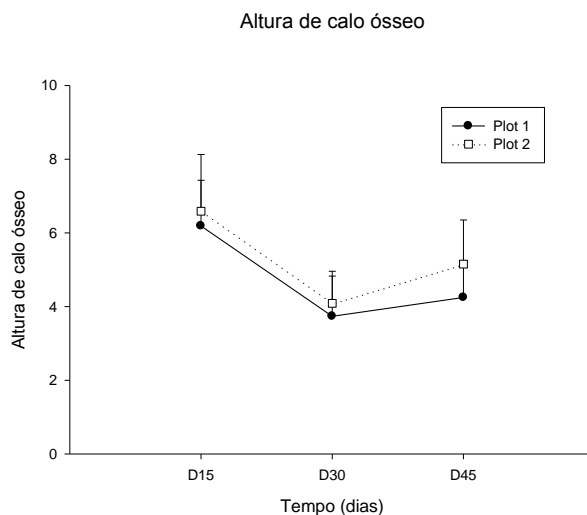


Figura 21– Altura de calo ósseo na tíbia de coelhos após 15, 30 e 45 dias de indução experimental de falha óssea e tratados com NaCl 0,9% (controle) ou nandrolona.

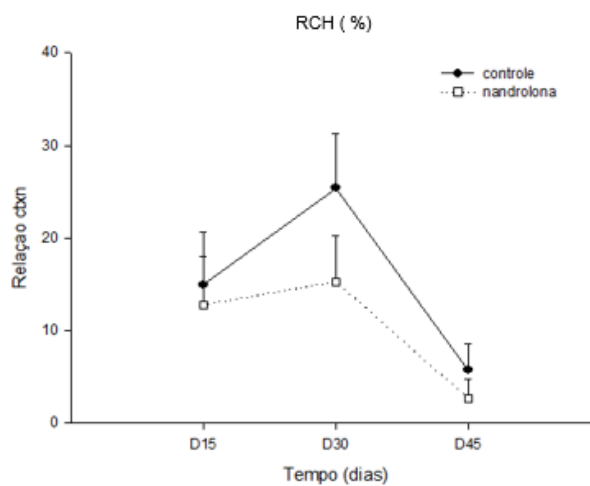


Figura 22– Relação osteoclasto:altura de calo ósseo observados na tíbia de coelhos após 15, 30 e 45 dias de indução experimental de falha óssea e tratados com NaCl 0,9% (controle) ou nandrolona.

Tabela 2 - Variação (média \pm erro padrão) de número de osteoclastos por campo, altura de calo ósseo em milímetros e relação CTH observada em coelhos submetidos à falha óssea na tíbia não tratados e tratados com decanoato de nandrolona, observados aos 15 (D15), 30 (D30) e 45 (D45) dias de pós-operatório.

	Controle			Nandrolona		
	D15	D30	D45	D15	D30	D45
Número de C/por campo	0,597 \pm 0,173	0,706 \pm 0,139	0,208 \pm 0,111	0,528 \pm 0,115 *	0,547 \pm 0,139 *	0,069 \pm 0,045
Altura do calo ósseo (mm)	6,187 \pm 1,941	3,737 \pm 1,222	4,247 \pm 0,989	6,588 \pm 0,840	4,088 \pm 0,740	5,152 \pm 1,197
Relação CH (%)	6,187 \pm 1,941	3,737 \pm 1,222	4,247 \pm 0,989	6,588 \pm 0,840	4,088 \pm 0,740*	5,152 \pm 1,197

* diferente de D45 (p<0,05)

8. DISCUSSÃO

A remodelação do endóstio e reestabelecimento da integridade do canal medular é a última etapa observada no processo de reparo ósseo (KALFAS, 2001; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS et al., 2007). Coelhos submetidos à falhas ósseas e tratados com nandrolona apresentaram integridade do endóstio aos 40 dias, diferente dos não tratados cuja ponte óssea era exclusivamente da cortical externa (AITHAL et al., 2009). Sugere-se que a falha na integridade da consolidação da cortical interna encontrada em alguns animais do grupo 45 dias possa ter ocorrido devido ao retardo no processo de reparo desencadeado pela infecção do sítio cirúrgico (cinco animais do grupo controle e três do grupo tratamento). Além da infecção clínica estabelecida, o infiltrado granulocítico e macrófagos acompanhados de lise de trabécula óssea foram evidenciados na avaliação morfológica, reafirmando a presença de infecção neste grupo (KUMAR et al., 2008b).

Considerando que o procedimento cirúrgico se deu por meio de técnica asséptica e com terapia antimicrobiana apropriada, alguns fatores podem ter supostamente contribuído para a infecção do sítio cirúrgico, como o sistema imunológico dos animais e a suscetibilidade à microtraumas durante a tricotomia devido à pele delgada característica da espécie (TULLY; MITCHELL; 2009; FOSSUM, 2008).

Embora o processo infeccioso possa ter interferido na consolidação do orifício, a avaliação morfológica revelou que as etapas do processo de reparo aconteceram dentro do tempo pré - determinado pela literatura (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008 KOLAR et al., 2010). Aos 15 dias predominou a presença de um tecido fibrocartilaginoso com alguns resquícios de tecido de granulação e início de um processo de osteogênese que, com 30 dias, cedeu espaço ao tecido ósseo mais denso e trabecular, e finalmente, mineralização das trabéculas aos 45 dias. A cronologia dos achados demonstra que, nesta espécie, a partir dos 15 dias de reparo ósseo já existe a formação de calo ósseo cartilaginoso com início de mineralização e presença de infiltrado celular de fibroblastos, que evolui para um tecido ósseo mais denso até os 45 dias de reparo, havendo sobreposição dos acontecimentos conforme revisado na

literatura (ROZEN et al., 2007; MATOS; ARAÚJO; PAIXÃO, 2008; SCHINDELER et al., 2008; KOLAR et al., 2010).

Embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos controle e tratamento nos tempos estudados, alguns aspectos devem ser considerados na avaliação ao longo do tempo: o processo inflamatório teve menor duração no grupo tratado com nandrolona envolvendo aos 30 dias, enquanto manteve-se presente no grupo controle; a contagem de osteoclastos e a relação de osteoclastos e altura do calo, foi reduzida significativamente nos coelhos tratados com nandrolona, diferente do observado no grupo controle. Segundo Hadjidakis e Androulakis (2006), os osteoclastos representam o tipo celular com atividade aumentada na fase final de remodelamento ósseo, desta forma a redução significativa na sua contagem ao longo do tempo bem como processo inflamatório menos duradouro nos animais tratados com nandrolona sugerem discreta antecipação das fases do reparo ósseo e remodelamento ósseo precoce.

O fato do decanoato de nandrolona acelerar o processo de reparo ósseo, já foi evidenciado por outros autores ao avaliarem radiografias de coelhos submetidos à falha óssea. Abedi et al (2012) visualizaram desaparecimento da radioluscência nas regiões da falha óssea aos 45 dias no grupo tratado com nandrolona enquanto o grupo controle apresentou defeitos radioluscentes sem evidência de preenchimento ósseo. De forma semelhante, Ahmad et al. (2009) constataram que os animais tratados com nandrolona revelaram calo ósseo mais denso e desaparecimento do *gap* da fratura aos 40 dias, que não ocorreu totalmente no grupo que não recebeu o tratamento.

Avaliações histoquímicas e histopatológicas do calo ósseo já revelaram previamente que, tanto o grupo controle como o grupo tratamento evoluíram para a consolidação óssea final, porém, o decanoato de nandrolona promoveu maiores atividade osteoblástica e mineralização do calo ósseo (AHMAD et al., 2009). Essa observação justifica a ausência de diferença estatística no presente estudo entre os grupos controle e nandrolona quando comparado o calo ósseo de forma quantitativa e morfométrica e não por meio de variáveis qualitativas.

Diversos marcadores bioquímicos são utilizados na rotina clínica para identificar atividade óssea, sendo a osteocalcina e a fosfatase alcalina representantes do processo de formação tecidual (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002). Uma vez que ambos são sintetizados e refletem a atividade dos osteoblastos, a mensuração sérica da osteocalcina e da fosfatase óssea seriam parâmetros adicionais válidos capazes de avaliar qualitativamente e sugerir a atuação deste tipo celular nos animais tratados com nandrolona.

A idade dos animais utilizados nesta pesquisa pode ter sido fator determinante para a discreta contribuição do DN no processo de reparo ósseo, haja vista que coelhos da raça nova Zelândia atingem a puberdade entre 150 – 180 dias (COUTO, 2002). O papel do IGF-1 no processo de diferenciação celular dos condroblastos, fibroblastos e mioblastos é mais evidente na fase adulta (GOMES; TIRAPEGUI, 1998). Desta forma, uma vez que o DN aumenta a expressão do IGF-1, a sua atuação na proliferação óssea em animais jovens pode ter sido limitada, o que não significa que o esteroide não seja capaz de atuar em indivíduos na fase adulta e/ou senis.

Ainda nesta justificativa, a concentração de IGF-1 é maior não somente na idade adulta, mas também na presença de atividade física. Os receptores de IGF-1 encontram-se distribuídos de forma abundante na musculatura esquelética e a elevação deste fator secundária ao exercício, aumenta a afinidade e capacidade de ligação do fator com seus receptores, resultando em síntese muscular proteica elevada (GOMES; TIRAPEGUI, 1998). A associação do DN com a reabilitação física em ratos após lesão óssea promoveu ganhos consideráveis no que diz respeito à contração muscular (JOUAAA; LEOTY, 2000). No presente estudo, houve restrição de atividade física devido ao manejo em gaiolas, caracterizando mais um fator limitante para a ação anabólica do IGF-1 no tecido musculoesquelético.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. (2006) destacam a atividade física como uma dos fatores mecânicos essenciais para a remodelação óssea. A tensão exercida nos osteócitos pela musculatura os induzem a produção de fatores reguladores que estimulam os osteoblastos, formadores de matriz celular. Da mesma forma, a ausência de atividade muscular induz a reabsorção óssea exacerbada. Assim, pode-se propor que a

nandrolona contribua também, de forma indireta, no tratamento de animais com perda óssea quando associada à atividade física, devido aos estímulos mecânicos impostos ao tecido ósseo por meio dos grupos musculares.

A utilização do esteroide sintético em coelhos hígidos sem patologias específicas não foi capaz de gerar resultados significativos, o que não significa que o fármaco não atue estimulando o tecido ósseo em paciente senis e/ou debilitados. Coelhos com osteoporose induzida tratados com decanoato de nandrolona obtiveram menor perda óssea quando comparados ao grupo controle e, inclusive, cães idosos tratados com nandrolona avaliados por métodos de imagem obtiveram nova aposição do tecido ósseo, caracterizando em ambas as espécies o efeito osteogênico do fármaco por inibição da reabsorção óssea e capacidade de prevenir ou corrigir parcialmente a rarefação óssea tecidual (DHEM; ARS-PIRET; WATERSCHOOT, 1980). Resultados semelhantes também foram encontrados em coelhos com osteoporose induzida por suplementação de vitamina D e cálcio em que o grupo tratado com nandrolona aumentou significativamente a densidade mineral óssea dos fêmures avaliados radiograficamente (AITHAL et al., 2009).

Baseado nos aspectos bioéticos da experimentação animal, o número de animais utilizados em cirurgia experimental deve ser considerado e reduzido de forma a alcançar informações estatísticas válidas (DAMY et al, 2010). Muito embora os procedimentos tenham sido padronizados e os métodos acurados, a hipótese da eficácia do decanoato de nandrolona foi rejeitada quando comparados, de forma paramétrica, os grupo controle e nandrolona. Tais resultados, sem significância estatística, não devem ser desconsiderados no que diz respeito à contribuição científica, pois podem assegurar a não redundância de estudo futuros e racionalizar a utilização de animais na cirurgia experimental, conforme recomendado pela princípio dos 3 Rs de Russel & Burch et al (1959) (redução do número de animais, refinamento de técnica e substituição por modelos) (PUOPOLO, 2004; DAMY et al., 2010).

Mesmo que as evidências deste trabalho e a bibliografia consultada proponham a utilização do decanoato de nandrolona como promotor do reparo ósseo, deve-se ressaltar que vários são os fatores que interferem no processo de regeneração. Dentre as variáveis que interferem diretamente na fisiologia do

reparo de uma fratura, destacam-se a estabilidade mecânica local promovida pela aplicação de implantes variados, a técnica cirúrgica empregada na preservação dos tecidos moles e a utilização de enxertos biológicos e sintéticos (GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007). A falha de quaisquer um destes componentes, bem como os fatores intrínsecos e extrínsecos do próprio paciente refletem diretamente no retardo do processo reparo ósseo. A nandrolona pode ser um agente adjuvante na terapia, porém não substitui uma das variáveis ressaltando a necessidade de técnica cirúrgica, implantes e enxerto aplicados de forma a respeitar os conceitos de osteossíntese biológica e biomecânica óssea, bem como a seleção do paciente apropriado para a terapia de acordo com o seu escore biológico.

9. CONCLUSÕES

O decanoato de nandrolona interfere no processo de reparo ósseo, porém não a ponto de gerar resultados estatisticamente significativos na avaliação macro e microscópica do calo ósseo da tíbia de coelhos submetidos à falha óssea experimentalmente induzida.

10. PERSPECTIVAS

Avaliações qualitativas do calo ósseo como marcadores imunohistoquímicos de diferenciação celular e atividade osteoblástica podem ser ferramentas úteis na compreensão da atuação do decanoato de nandrolona no reparo ósseo. Assim, o decanoato de nandrolona pode ser considerado um agente adjuvante no tratamento de fraturas em pacientes selecionados, obviamente sem dispensar técnica cirúrgica adequada e osteossíntese biológica.

11. REFERÊNCIAS

ABEDI, G.; ALIZADEH, R.; ASGHARI, A.; SEDGHANI, P.. Radiographic evaluation of androgen on tibial bone defect healing in rabbit. **Pelagia Research Library**, v. 2, n.4, p.1315–1319, 2012.

ABUD, S. F. A.; CAMPOS, A. G., BRASIL, F. B. Casuística de exames radiográficos realizados no hospital veterinário da faculdade dr . Francisco maeda no segundo semestre de 2008. **Nucleus Animalium**, v. 2, n.1, p. 53–62, 2010.

AHMAD, F.; YUNUS, S. M., ASGHAR, A.; FARUQI, N. A. Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits - a study on experimental model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.1, p. 93–96, 2013. doi:10.7860/JCDR/2012/4863.2679

AITHAL, H. P.; KINJAVDEKAR, P.; AMARPAL, PAWDE, A M.; SINGH, G. R.; PATTANAIK, A K.; SETIA, H. C. Effects of Nandrolone and TGF-beta1 in growing rabbits with osteopenia induced by over-supplementation of calcium and vitamin D3. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 4, p. 331–43, 2009. doi:10.1007/s11259-008-9181-4

ALJUMAILY, M. A. Open osteotomy of ulna as a model for fracture healing studies in rabbits. *Journal of the faculty of medicine.*, v. 52, n. 3, p. 259-262, 2010.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina veterinária. Resolução nº1000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. **Diário oficial da União**, 17 de maio, 2012.

CALASANS-MAIA, M. D.; MONTEIRO, M. L.; ÁSCOLI, OF.;GRANJEIRO, J. M.. T O coelho como modelo animal para cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p.325–328, 2009.

CARDOZO, C. P.; QIN, W.; PENG, Y.; LIU, X.; WU, Y.; PAN, J.; BAUMAN, W. A.; ZAIDI, M.; SUN, L.. Nandrolone slows hindlimb bone loss in a rat model of bone loss due to denervation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 303-306, 2010. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05313.x

COUTO, S. E. R.Criação e manejo de Coelhos. In:_____ **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388 p. Disponível em : <<http://books.scielo.org>>.

CUBAS Z.S., RAMOS DA SILVA J.C., CATÃO-DIAS J.L. Lagomorpha. In:_____ **Tratado de Medicina Veterinária de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p.415-431.

CUNHA, O. Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos. Dissertação (Doutorado em ciências) -

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n.1, p.103–111, 2010.

DUTRA, B. S. C.; PAGANI, M. M.; RAGNINI, M. P. Esteróides Anabolizantes: uma abordagem teórica. **Revista Da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 3, n.2, p.21–39, 2012.

DBEM, A.; ARS-PIRET, N.; WATERSCHOOT, M. P.; The effects of nandrolone decanoate on rarefying bone tissue. **Research Article**, vol. 6, n. 9, p. 606-613, 1980.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I.; ALOBERA-GRACIA, M. A.; DEL-CANTO-PINGARRÓN, M.; BLANCO-JEREZ, L.. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, v.11, n.2, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505794>. Acesso em: 10 jul 2014.

FOSSUM, T. W. Preparação do campo operatório. In: _____ **Cirurgia de pequenos animais**. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.32-37.

FUSATTO, E. D. L. Efeito da nandrolona em músculo esquelético imobilizado. **Saúde em Revista**, v.13, n.33, p.77–79, 2010.

GENNARI, C.; AGNUSDEI, D.; GONNELI, S.; NARDI, P. Effects of nandrolone decanoate therapy on bone mass and calciu metabolism in women with established post-menopausal osteoporosis: a doubçe-blind placebo-controlled study. **Maturitas**, v. 11, p. 187–197, 1989.

GERBER, C.; MEYER, D.C. ; NUSS, K.M.; FARSHAD, M. Anabolic Steroids Reduce Muscle Damage Caused by Rotator Cuff Tendon Release in an Experimental Study in Rabbits. **American Journal of Bone Joint Surgery**, v. 93, n. 23, p.2189-2195, 2011. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.J.01589>

GIANNOUDIS, P.; PSARAKIS, S.; & KONTAKIS, G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. **Injury**, v. 38, n. 1, p. 81–89, 2007. doi:10.1016/j.injury.2007.02.013

GIANNOUDIS, P. V.; EINHORN, T. A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. **Injury**, v.38, n.4, p.3–6, 2007. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18224731>

GOMES, N. R.; TIRAPEGUI, J. Relação entre o fator de crescimento semeçhante à insulina (IGF-1) e atividade física. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**. v. 3, n. 4, p. 66-76, 1998.

GREENAWAY, J.B.; PARTLOW, G. D.; GONSHOLT, N.L.; FISHER, K.R.; Anatomy of the lumbosacral spinal cord in rabbits. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 1. p. 27-34, 2001.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385–96, 2006. doi:10.1196/annals.1365.035

JOUMAA, W. H.; LEOTY, C. Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow rat skeletal muscles. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**, p. 397–403, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____ **Histologia Básica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koongan, 2008. p. 135–152.

KALFAS, I. H.. Principles of bone healing. **Neurosurgical Focus**, v.10, n.4, p.1, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732625>. Acesso em:

KASPERK, C. H.; WAKLEY, G. K.; HIERL, T.; ZIEGLER, R.. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 3, p. 464–471, 1997. doi:10.1359/jbmr.1997.12.3.464

KERAMARIS, N. C.; CALORI, G. M.; NIKOLAOU, V. S.; SCHEMITSCH, E. H.; GIANNOUDIS, P. V.). Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. **Injury**, v. 39, n.2, p. 45–57, 2008. doi:10.1016/S0020-1383(08)70015-9

KOHN, D. F., MARTIN, T. E., FOLEY, P. L., MORRIS, T. H., SWINDLE, M. M., VOGLER, G. A., WIXSON, S. K.; TOTH, L. A.. Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 46, n.2, p. 97–108, 2007.

KOLAR, P., SCHMIDT-BLEEK, K., PH, D., SCHELL, H., GABER, T., TOBEN, D., SCHMIDMAIER, G.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; DUDA, G. N. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. **Tissue Engineering: Part B**, v.16, n. 4, p. 427–434, 2010. doi:10.1089/ten.teb.2009.0687

KUMAR, V.; ABBAS, A. K., FAUSTO, N.; RICHARD N. M. Sistema músculo esquelético. In: _____ Robbins **Patologia básica**. Rio de Janeiro: elsevier, 2008.

LUCAS, S. S.; ALIEVI, M. M.; CONY, A. V.; SCHOSSLER, J. E. W. Fraturas distais de fêmur em cães e gatos . Revisão de 55 casos. **Revista Da FZVA**, v. 7, n. 1, p. 75–83, 2001.

LUNA, L. G. **Manual oh Histologic Staining Methods; of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3 Ed. New York: MacGraw Hill, 1968, 258 p.

MATOS, M. A.; ARAÚJO, F. P.; PAIXÃO, F. B. Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 3, n.4, p. 1-5, 2008.

MITCHELL, M. A.; TULLY, T. N. J. Rabbits. In: _____ **Manual of Exotic Pet Practice**. China: Saunders, 2009. p.375-403.

MONTECINOS, B. R.; ZENI, S. N. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 43, n. 2, p. 177–193, 2009.

MOTA, F. D. C.; REBELLATO, K. R.; MORAES, A. C.; OKUBO, R.; BELO, M. A. A.; EURIDES, D. Análise das propriedades mecânicas da tíbia de ratos submetida à osteotomia por escareação e tratada com decanoato de nandrolona. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 3, n. 6, p. 57–59., 2010.

MOTTA, V. T.. Metabolismo Mineral e Ósseo. In:_____ **Bioquímica Clínica pra o laboratório: Princípios e interpretações**, v.5 , p. 143–166, 2009.

NATALINI, C. C, Lagomorfos e pequenos roedores. In:_____ **Teoria e técnicas em anestesiologia veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.161-163.

PALERMO NETO, J. Anabolizantes In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 528

PARDI, A. C. R. Ação da nandrolona no padrão energético do músculo esquelético imobilizado: Estudo em ratos. 2010. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Faculdade de ciências da saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2010.

PASSERI, M.; PEDRAZZONI, M.; PIOLI, G.; BUTTURINI, L.; RUYS, A H.; CORTENRAAD, M. G. Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. **Maturitas**, v.17, n. 3, p. 211–219, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8133796>

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36 n. 3, p. 5–7, 2005. doi:10.1016/j.injury.2005.07.0272005)

PUOPOLO, M. Bioestatistical Approaches to reducing the number of animals used in biomedical research. **Annali Dell` Istituto Superiore Di Sanità**, v. 40, n. 2, p. 157–163, 2004.

ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197–213., 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17725489>. Acesso em: 13/11/2013

SARAIVA, G. L.; CASTRO-LAZARETTI, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação óssea na Prática Clínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabologia**, v. 46, n.1, p. 72-78, 2002

SARANTEAS, T.; MOUROUZIS, C.; MEZITIS, M.; TESSEROMATIS, C.; SPYRAKI, C. Interaction between nandrolone decanoate and calcitonin in bone formation markers (osteocalcin and bone specific alkaline phosphatase) and IGF-I in rats. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 2, n. 2,

p. 167–170, 2001. Disponível em :
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758466>. Acesso em: 13/11/2013

SCHALCH, T. D.; FERRARI, R. A. M.; SOUZA, N. H. C.; ALBARELLO, P. M.; FRANÇA, C. M.; BUSSADORI, S. K.; MARTINS, M. D.; FERNANDES, K. P. S. Effect of steroid nandrolone decanoate on osteoblast-like cells. **Medica Science and Technology**, v. 54, p. 107–111, 2013.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G.. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 459–466, 2008. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.004

SILVA, W. G. E.; MUZZI, L. A. L.; REIS, I. A.; SAMPAIO, G. R.; MUZZI, R. A. L.; MELO, D. G. Fraturas ósseas em cães e gatos: estudo retrospectivo. In: **XVI congresso de pós-graduação da UFLA.**, 2007. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007, p. 1–6.

TAKAYANAGI, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 3, p. 170–179, 2005. doi:10.1007/s00109-004-0612-6

TENGSTRAND, B.; CEDERHOLM, T.; SÖDERQVIST, A.; TIDERMAR, J.. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone on bone tissue after a hip fracture. **Clinical Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 460–465., 2007. doi:10.1016/j.clnu.2007.03.007

THIBLIN, I.; PETERSSON, A. Pharmacoeconomics of anabolic androgenic steroids: a review. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, n.1, p. 27–44, 2005. doi:10.1111/j.1472-8206.2004.00298.x

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, n. 1, p.11–25, 2007. doi:10.1016/j.injury.2007.02.006

YUN, S.; LIM, J.-H.; RAHMAN, M. M.; BYEON, Y., KIM, W.-H., & KWEON, O.-K.. Effect of Nandrolone Decanoate on Disuse Muscle Atrophy and Bone Healing in Dogs. **Journal of Veterinary Clinics**, v. 22, n.4, p. 336–341, 2005.