

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

ROSÂNGELA RAFFAELLI LOPES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO TÓPICA DA
TESTOSTERONA SOBRE O TECIDO ÓSSEO E SUA
RELAÇÃO COM A ESTIMULAÇÃO DA
NEOFORMAÇÃO ÓSSEA. ESTUDO EM RATOS
MACHOS.**

Porto Alegre, 2009

ROSÂNGELA RAFFAELLI LOPES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO TÓPICA DA
TESTOSTERONA SOBRE O TECIDO ÓSSEO E SUA
RELAÇÃO COM A ESTIMULAÇÃO DA
NEOFORMAÇÃO ÓSSEA. ESTUDO EM RATOS
MACHOS.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ORIENTADOR: PROF. DR. GUILLERMO WASSERMANN

Porto Alegre, 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pela proteção, pela saúde, pela confiança e pelo amor. À minha família, em especial, a meu tio e padrinho Celso Raffaelli, meu grande incentivador profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Guillermo Wassermann, meu orientador, por ter compartilhado comigo uma parte de seu imenso conhecimento, mas acima de tudo, pelo que aprendi em termos de ética, organização e seriedade no mundo científico: onde muito mais do que ser, interessa o saber; muito mais do que parecer, vale a consciência tranqüila de que dentro das possibilidades existentes, o melhor foi feito, visando resultados que possam ser compartilhados e aplicados por outros pesquisadores.

À professora Eloísa Loss por todo incentivo e ajuda.

Ao professor Marcelo Grillo por sua colaboração, amizade, auxílio e sua enorme paciência e persistência durante toda a realização deste trabalho, em especial durante a parte experimental.

Ao professor João Batista Burzlaff acima de tudo pela amizade, mas também por sua ajuda e orientação na elaboração da parte histológica do experimento.

Aos doutorandos do Curso de Pós-graduação em Patologia Veterinária/UFRGS, Juliano de Souza Leal e Djeison Lutier Raymundo pelo auxílio tanto na confecção das lâminas da parte histológica, como na análise descritiva e nos resultados do experimento. Também ao prof. David Driemeier, Coordenador do Serviço de Patologia Veterinária/UFRGS por ter possibilitado a realização de toda a parte histológica em seu Serviço, desde a confecção das lâminas, análise e resultados, bem como a aquisição das imagens em microscópio específico para este fim.

À amiga Viviane Todt, professora de informática da UNISINOS, pelo apoio nas horas mais difíceis e pela ajuda na análise das imagens da parte histológica.

Aos colegas do curso e do Laboratório, em especial à Ana Paula Jacobus, à Débora Olmedo Rodrigues, à Chris Danielevikz Krebs e, à técnica Elsa Pires pelo apoio oferecido e pelo agradável convívio.

Aos colegas, professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e do Curso de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia do ICBS, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq, Propesq.

À UFRGS, pela minha formação.

Aos meus pais Jair e Elsa, e minha irmã Eliana, grandes incentivadores, que durante este período em que estive afastada de seu convívio estavam sempre por perto, me apoiando, me ajudando. Obrigado por sua compreensão e carinho.

À minha avó, Romalina que sempre me incentivou a ir atrás de meus objetivos, por mais difíceis que pudessem parecer.

Aos meus parentes, amigos e a todas as pessoas que de alguma forma participaram da minha vida durante este trabalho.

À Deus por tudo.

OBRIGADO

EPÍGRAFE

“Espero que...

*Espero que você possa aceitar as coisas como elas são
Sem pensar que tudo conspira contra você,
Porque parte de nós é entendimento...
Mas a outra parte é aprendizado...*

*Que você possa ter forças para vencer
Todos os seus medos
E que, no final, possa alcançar todos os
Seus objetivos
Porque parte de nós é cansaço...
Mas parte de nós é vontade...*

*Que tudo aquilo que você vê e escuta
Possa lhe trazer conhecimento
Que essa escola possa ser longa e feliz
Porque parte de nós é o que vivemos...
Mas a outra parte é o que esperamos...*

*Que você possa aprender a perder
Sem se sentir derrotado
Que isso possa fazer você cada vez mais guerreiro
Porque parte de nós é o que temos...
Mas a outra parte é sonho...*

*Que durante a vida você possa
Construir sentimentos verdadeiros
Que você possa aceitar que só quem soube da sombra,
Pode saber da luz...
Porque parte de nós é angústia...
Mas a outra parte é conforto...*

*Que você nunca deixe de acreditar
Que nunca perca sua fé
Porque parte de DEUS é amor...
E a outra parte também!”*

Autor Desconhecido

RESUMO

Os esteróides sexuais (andrógenos e estrógenos) são importantes reguladores do metabolismo ósseo em machos e fêmeas, respectivamente. A Testosterona, o hormônio andrógênio natural, predominante no sexo masculino, tem papel fundamental em relação à manutenção da massa óssea, pela sua ação sistêmica. O objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente a ação do Propionato de Testosterona (PT) sobre o tecido ósseo, aplicado de forma tópica na tíbia de ratos machos, observando a regeneração óssea e, se ele promove aceleração nesta regeneração. Defeitos ósseos de 1,5mm de diâmetro, foram realizados nas duas tíbias de 30 ratos, sendo que 15 haviam sido castrados previamente e os outros 15 não. Após randomização, numa das tíbias do grupo experimental foi aplicado esponja de colágeno (Gelfoan[®](G))+PT e na outra G+Óleo Mineral (OM). No grupo controle, uma das tíbias recebeu apenas Gelfoan e na outra foi realizado apenas o defeito ósseo. Os animais dos grupos experimentais foram sacrificados aos 15 e 30 dias pós-operatórios, e os dos grupos controle, foram sacrificados aos 15 dias pós-operatórios. Os ratos que foram sacrificados aos 30 dias receberam duas aplicações das substâncias em avaliação. Realizou-se análise macroscópica das peças, além das análises histológicas descritiva/comparativa e descritiva semi-quantitativa. Com relação a formação de osso entre as corticais (cicatrização do defeito ósseo criado), tanto G isolado como G+PT ou G + OM, apresentaram diferentes graus de cicatrização óssea entre os diferentes grupos: castrados e não castrados, sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e aos 30 dias. Foi achado que o grupo castrado sacrificado aos 15 dias que recebeu G+PT teve cicatrização óssea, contrariamente ao grupo não castrado que não cicatrizou. Também no grupo castrado sacrificado aos 30 dias pós-operatórios observou-se formação de osso lamelar, estruturado nos animais tratados com G+PT. Pode-se dizer que o PT tópico nestes grupos contribuiu para neoformação óssea. Concluiu-se que: 1º) em dois grupos experimentais o PT teve melhores resultados, mas os dados obtidos não permitem uma conclusão definitiva; 2º) a Testosterona empregada de forma tópica mostrou-se promissora quanto a ativação da regeneração óssea; 3º) o Propionato de Testosterona não parece ser a forma farmacêutica mais apropriada, devido a sua forma de liberação muito lenta do hormônio e conseqüente pouca eficiência, devendo-se utilizar como alternativas para aplicação da Testosterona, a mesma diluída em outro veículo e introduzida nos defeitos através de cápsulas de lisina tricalcio fosfato calcinado ou através de implantes combinando a Testosterona com partículas de poly(D,L-(lactide-co-glycolide)) conforme verificado na literatura. Estes resultados obtidos merecem ser aprofundados e aperfeiçoados, utilizando curvas dose-resposta, outros preparados de Testosterona e tempos distintos.

PALAVRAS-CHAVE*

Osteogênese - Regeneração óssea - Osteoblastos/osteoclastos/osteócitos- Andrógenos
– Testosterona - Forma de ação - Protocolos de tratamento

*DeCS - Descritores em Ciências da Saúde, disponível em <http://decs.bvs.br>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA 01 Esquema da remodelação óssea, esteróides sexuais e resistência mecânica.....	31
FIGURA 02 Esquema do mecanismo de ação de andrógenos em osteoblastos de fêmeas humanas.....	35
QUADRO 01 Esquema da randomização das patas dos animais, conforme o tipo de substância aplicada. Grupo dos ratos castrados.....	42
QUADRO 02 Esquema da randomização das patas dos animais, conforme o tipo de substância aplicada. Grupo dos ratos não castrados.....	42
FIGURA 03 Incisão longitudinal em pele e tecido subcutâneo.....	45
FIGURA 04 Após o descolamento e afastamento do retalho, visão da região onde será realizada a perfuração.....	46
FIGURA 05 Perfuração óssea com broca específica para o experimento, 10 mm abaixo do joelho do animal, em motor elétrico de baixa rotação.....	47
FIGURA 06 Broca utilizada para criar os defeitos ósseos nas tíbias.....	48
FIGURA 07 Curetagem da cavidade com cureta compatível para remoção de tecido ósseo esponjoso/medular, bem como da poeira óssea proveniente da perfuração executada com a broca.....	48
FIGURA 08 Pipeta medindo a substância a ser aplicada e sua colocação no Gelfoan antes da introdução na cavidade.....	49
FIGURA 09 Introdução do Gelfoan com o Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral no defeito ósseo criado cirurgicamente, utilizando pinça compatível.....	50
FIGURA 10 Sutura a pontos isolados.....	50
FIGURA 11 Esquema do corte das tíbias. As peças foram seccionadas no sentido longitudinal do osso.....	52

- FIGURA 12** Peças operatórias do Grupo Controle: grupos Gelfoan (A) e Perfuração (preenchimento por coágulo de sangue) (B) – **15 dias – Animais Castrados**. Observa-se no grupo do Gelfoan preenchimento parcial da cavidade com tecido mole, porém há formação óssea abaixo do tecido mole, e em B ossificação preenchendo a cavidade..... **58**
- FIGURA 13** Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B e C) – **15 dias – Animais Castrados**. Observa-se no grupo experimental preenchimento total da cavidade no grupo que recebeu Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A). No grupo que recebeu Gelfoan mais Óleo Mineral observa-se formação de grande fibrose recobrindo a cavidade (B). Em (C), após a remoção desta fibrose, verifica-se a cavidade preenchida por tecido mole..... **59**
- FIGURA 14** Peças operatórias do Grupo Controle: grupos Gelfoan (A) e Perfuração (preenchimento por coágulo de sangue) (B) – **15 dias – Animais Não Castrados**. Observa-se completa ossificação nas cavidades de ambos os tratamentos, porém os achados sugerem que a ossificação é maior no grupo que recebeu apenas a perfuração..... **60**
- FIGURA 15** Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona(A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – **15 dias – Animais Não Castrados**. No grupo experimental observa-se fibrose recobrindo as cavidades tanto nas patas tratadas com Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A), quanto nas tratadas com Gelfoan mais Óleo Mineral (B). Esta fibrose abrange as cavidades e recobre o tecido ósseo circunvizinho, porém é menor no grupo do Propionato de Testosterona que no do Óleo Mineral..... **60**
- FIGURA 16** Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – **30 dias - Animais Castrados**. Observa-se completa ossificação e desaparecimento dos limites da cavidade nas patas tratadas com Gelfoan mais Propionato de Testosterona (o tecido ósseo formado é semelhante ao tecido ósseo adjacente) (A). No grupo com Gelfoan e Óleo Mineral, há tecido ósseo preenchendo totalmente a cavidade, observar nas proximidades da cavidade a presença de fibrose..... **61**

- FIGURA 17** Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona(A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – **30 dias - Animais Não Castrados**. Observa-se em ambos os grupos grande quantidade de osso neoformado nos defeitos, e diminuição do diâmetro das cavidades, porém no grupo tratado com Gelfoan mais Óleo Mineral há discreta fibrose recobrando a cavidade..... **61**
- FIGURA 18** Grupo Controle: grupos Gelfoan (A) e Perfuração (preenchimento por coágulo de sangue) (B) – **15 dias – Animais Castrados**. Observa-se em ambos os grupos neoformação óssea entre as corticais, significando cicatrização do defeito. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... **63**
- FIGURA 19** Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – **15 dias - Animais Castrados**. Observa-se formação óssea entre as corticais e também ao redor do Gelfoan no grupo que recebeu Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A). No grupo que recebeu Gelfoan® mais Óleo Mineral (B) não observa-se cicatrização do defeito, apenas formação óssea reacional ao redor do Gelfoan que encontra-se localizado tanto entre as corticais quanto na região medular.Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz.Aumento de 40X..... **64**
- FIGURA 20** Grupo Controle: Gelfoan (A) e Perfuração (coágulo de sangue) (B) – **15 dias - Animais Não Castrados**. Observa-se em (A) o Gelfoan localizado na medular, entre as corticais e sobre a cavidade com grande reação óssea ao seu redor, porém sem cicatrização do defeito. Em (B), cicatrização do defeito com formação óssea entre as corticais. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... **65**
- FIGURA 21** Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – **15 dias - Animais Não Castrados**. Não observa-se formação óssea entre as corticais, apenas ao redor do Gelfoan no grupo que recebeu Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A). No grupo que recebeu Gelfoan mais Óleo Mineral observa-se formação óssea entre as corticais, mas não relacionada a elas, ou seja, não houve cicatrização do defeito criado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz.Aumento de 40X..... **66**

FIGURA 22 Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 30 dias - Animais Castrados. Os dois grupos são semelhantes quanto à neoformação óssea entre as corticais. O Gelfoan é observado sobre a cavidade com grande reação óssea e de tecido conjuntivo ao seu redor. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.....

67

FIGURA 23 Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 30 dias - Animais Não Castrados. Os dois grupos são semelhantes com neoformação óssea entre as corticais, porém em pequena quantidade, e o Gelfoan é observado dentro da cavidade e na região medular com grande reação óssea ao seu redor. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.....

68

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.....	69
TABELA 02 Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais castrados sacrificados aos 30 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.....	70
TABELA 03 Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais não castrados sacrificados aos 30 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.....	71
TABELA 04 Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais não castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Androstenediona
AR	Receptor de andrógenos
BMPs	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
CT	Calcitonina
D	Direita
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA -S	Sulfato de dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Estrógeno
E	Esquerda
EC	Esponja de colágeno
Es	Estrógenos
E1	Estrona
E2	Estradiol
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G	Gelfoan® – esponja de colágeno/gelatina
G+PT	Gelfoan + Propionato de Testosterona
G+OM	Gelfoan+ Óleo Mineral
iAR	Receptor androgênico intracelular
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
LH	Hormônio Luteinizante
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NO	Óxido nítrico
OM	Óleo mineral
P	Perfuração

PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PT	Propionato de Testosterona
PTH	Hormônio da paratireóide
T	Testosterona
TGFs	Transforming Growth Factors
VDR	Receptor nuclear de vitamina D
%	Porcento
A	Alfa
B	Beta
Mm	Micrometro(s)
®	Marca registrada
Mg	Micrograma(s)
Ng	Nanograma(s)
Mm	Milímetro(s)
Ca ²⁺	Íon cálcio

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. ALTERNATIVAS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	19
1.1.1. Enxertos Ósseos.....	19
1.1.2. Células Estromais da Medula Óssea (BMSC – Bone Marrow Stromal Cells).....	20
1.1.3. Fatores de Transformação de Crescimento (TGFs – Transforming Growth Factors).....	21
1.1.4. Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs – Bone Morphogenetic Protein).....	21
1.1.5. Biomateriais.....	22
1.1.6. Enxertos de Materiais Aloplásticos.....	22
1.1.7. Medicamentos.....	23
1.1.8. Hormônios.....	24
1.1.8.1. Esteróides Sexuais.....	24
1.1.8.2. Hormônio da Paratireóide (PTH) e Calcitonina.....	26
1.1.9. Vitamina D ₃	27
1.2. FISILOGIA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	28
1.2.1. Ciclo da Remodelação Óssea.....	28
1.2.2. Resistência Mecânica e Remodelação Óssea.....	29
1.2.3. Balanço Ósseo Negativo.....	29
1.2.4. Osso Esponjoso X Osso Cortical.....	30
1.2.5. Fatores que influenciam a homeostase óssea.....	31
1.3. ANDRÓGENOS: FISILOGIA E EFEITOS NO OSSO.....	33
1.3.1. Metabolismo de Andrógenos e Estrógenos.....	33
1.3.2. Receptores de Andrógenos em Células Ósseas.....	34
1.3.3. Fatores que controlam a expressão do receptor de andrógenos e função de osteoblastos.....	36
1.3.3.1. Proliferação de Osteoblastos.....	36
1.3.3.2. Diferenciação de Osteoblastos.....	36
1.3.3.3. Micro-ambiente Ósseo.....	37
1.4 TESTOSTERONA.....	38
2. OBJETIVOS	39
2.1. GERAL.....	39
2.2. ESPECÍFICOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	40
3.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
3.3. AMOSTRAGEM.....	41
3.4. CASTRAÇÃO DOS RATOS.....	44
3.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NAS TÍBIAS.....	45
3.6. INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO.....	52
3.6.1. Aspectos Histológicos Avaliados no Método Semi-quantitativo.....	54

4. RESULTADOS	56
4.1. DESCRIÇÃO DA OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS.....	56
4.1.1. Análise Macroscópica . 15 dias – Animais Castrados.....	56
4.1.2. Análise Macroscópica . 15 dias – Animais Não Castrados.....	57
4.1.3. Análise Macroscópica . 30 dias – Animais Castrados.....	57
4.1.4. Análise Macroscópica . 30 dias – Animais Não Castrados.....	58
4.2. DESCRIÇÃO DA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS E DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....	62
4.2.1. Avaliação Histológica Descritiva/Comparativa.....	62
4.2.1.1. Grupo Castrado G X P - 15 dias	62
4.2.1.2. Grupo Castrado G+PT X G+Óleo Mineral - 15 dias.....	63
4.2.1.3. Grupo Não Castrado G X P - 15 dias.....	65
4.2.1.4. Grupo Não Castrado G+PT X G+Óleo Mineral - 15 dias.....	66
4.2.1.5. Grupo Castrado G+PT X G+Óleo Mineral - 30 dias.....	67
4.2.1.6. Grupo Não Castrado G+PT X G+Óleo Mineral - 30 dias.....	68
4.2.2. Avaliação Histológica: Método Semi-quantitativo.....	69
4.2.2.1. Ratos Castrados - 15 dias.....	69
4.2.2.2. Ratos Castrados – 30 dias.....	70
4.2.2.3. Ratos Não Castrados – 30 dias.....	71
4.2.2.4. Ratos Não Castrados – 15 dias.....	72
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE	90
APÊNDICE A- Ficha de Coleta de Dados – Análise Descritiva Semi-quantitativa.....	90

1. INTRODUÇÃO

Ossos resistentes e saudáveis são dependentes da interação entre reabsorção e formação óssea. Este processo é controlado pela interação de osteoclastos e osteoblastos mais a influência modulatória de células mecânico-sensoriais do osso: os osteócitos. Ambos os esteróides sexuais – Estrógeno (E) e Testosterona (T)- têm receptores nas células ósseas, com predominância andrógena em osteoblastos e osteócitos (NOTELOVITZ, 2002).

Os esteróides sexuais (andrógenos e estrógenos) são os maiores reguladores do metabolismo ósseo em machos e fêmeas, respectivamente. Recentemente, receptores de andrógenos foram identificados nos osteoblastos, porém os mecanismos pelos quais os andrógenos exercem seus efeitos sobre o osso não estão totalmente esclarecidos (KASPERK et al., 1989; LIEBERHERR, GROSSE, 1994; NOTELOVITZ, 2002; FUJITA et al., 2004; FUJITA et al., 2006).

A Testosterona é o principal andrógeno testicular, sendo responsável além das características masculinas, pela formação, desenvolvimento e manutenção da massa óssea, muscular, etc. (SHKLAR et al., 1967; KASPERK et al., 1989; NOTELOVITZ, 2002).

Normalmente há uma gradual e contínua perda de osso trabecular e cortical tanto em homens quanto em mulheres durante o seu envelhecimento. Osteopenia e osteoporose são

condições nas quais as perdas resultam em ossos frágeis e de fácil fratura. Homens com baixa taxa de Testosterona e hipogonadismo estão pré-dispostos à osteoporose e devem ter cuidados para preveni-la, pois esta já é um grande problema na pós-menopausa feminina (SHAHTAHERI, 2007).

A deficiência de estrógeno é reconhecida como uma causa para a perda óssea pós-menopausa. Por outro lado, as densidades de osso cortical e esponjoso são reduzidas em homens com hipogonadismo antes do pico de massa óssea (FUJITA et al., 2004).

A castração de animais também induziria osteopenia e osteoporose, pela ausência de Testosterona e Estrógeno. Conforme BROULÍK e BROULÍKOVA (2007), os andrógenos exercem marcado efeito na homeostase óssea e a orquidectomia em ratos machos maduros rapidamente desenvolve osteopenia em seu fêmur.

Em experimentos com animais, tem sido demonstrado que ao serem ovariectomizados e orquidectomizados há indução de perda óssea, sendo os estrógenos e os andrógenos efetivos na prevenção de perda óssea durante a adolescência (FUJITA et al., 2001 *apud* FUJITA et al., 2004).

Em suma, todos estes fatores citados, relacionados à diminuição ou ausência de Testosterona, apresentam como resultados a diminuição da regeneração óssea e a osteoporose.

Embora tenha-se encontrado na literatura trabalhos avaliando a ação da Testosterona sobre o osso, estes são em sua maioria *in vitro* (KASPERK et al., 1989; LIEBERHERR, GROSSE, 1994), ou em animais (ROSSI, CALO, 1966; FUJITA et al., 2006), estes últimos avaliando a ação da Testosterona aplicada de forma sistêmica (SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006; FUJITA et al., 2004; VANDENPUT et al., 2004). Estes trabalhos, normalmente, apresentam resultados positivos quanto ao emprego da Testosterona, melhorando os quadros de osteoporose, diminuindo sintomas e acelerando a regeneração óssea, cujos resultados são comprovados através de avaliações histológicas, histomorfométricas ou de exames de imagem.

Não encontrou-se na literatura trabalhos avaliando a ação da Testosterona de forma tópica. Neste sentido, julgou-se necessária a realização de um estudo para avaliar esta ação sobre o tecido ósseo de ratos, uma vez que de forma tópica minimizam-se os outros efeitos androgênicos deste hormônio, por exemplo, adenoma ou câncer de próstata. Para tanto, pretende-se avaliar a ação tópica da Testosterona e suas alterações histológicas e/ou aceleração na formação de osso em soluções de continuidade criadas nas tíbias de ratos machos castrados ou não, com ou sem tratamento tópico de Testosterona.

Por outro lado, uma grande preocupação da medicina e da odontologia na atualidade, mais especificamente em Cirurgia Buco-Facial e Implantodontia, tem sido a busca de materiais de enxerto para a reconstrução e/ou substituição de estruturas ósseas em geral e do complexo maxilomandibular, danificadas por traumatismos, por patologias ósseas tanto de caráter inflamatório quanto neoplásico, por anomalias de desenvolvimento ou iatrogenias. Outra aplicação relevante é a preparação do leito receptor para implantes, que posteriormente serão utilizados para ancoragem de próteses dentárias, em reconstruções estéticas e funcionais (CHAVES et al., 2004).

O crescimento craniofacial apresenta grandes variações individuais, e o crescimento mandibular é relacionado a vários fatores, como hormônio do crescimento, fatores de crescimento, hereditariedade e mecanismos de estresse. Os efeitos dos hormônios sexuais no desenvolvimento de ossos e músculos são relacionados a fatores ambientais e genéticos (FUJITA et al., 2006).

FUJITA et al. (2004), em seu estudo, encontraram que a supressão da secreção dos hormônios sexuais durante a fase de crescimento puberal inibe o crescimento craniofacial, particularmente o crescimento mandibular, e resulta na redução do desenvolvimento

craniofacial. Esta alteração do crescimento não ocorre, porém, apenas na puberdade, mas também logo após o nascimento frente a distúrbios nos hormônios sexuais.

Por outro lado, a reabsorção dos rebordos alveolares após extrações dentárias também deve ser incluída nas causas de perda óssea. Conforme PERRI DE CARVALHO et al. (2002), o osso é um tecido rígido que serve a duas funções primordiais: suporte estrutural e metabolismo de cálcio, porém não admite carga excessiva. Após exodontias, o processo alveolar é afetado com muita frequência. A lâmina cortical vestibular é a primeira a remodelar ou reabsorver após exodontias, infecções ou traumas. Na região anterior da maxila, o osso alveolar é rapidamente remodelado, ocorrendo perda de 25% do volume durante o primeiro ano e de 40 a 60% da espessura nos primeiros três anos após extrações. Esta reabsorção ocorre principalmente a custas da lâmina cortical vestibular. Nas regiões posteriores, o índice de perda óssea inicial é geralmente maior do que nas regiões anteriores, porém o volume inicial de reabsorção posterior é o dobro do anterior e, mesmo com perda óssea de 50%, geralmente deixa um volume adequado para instalação de um implante de 4 mm de diâmetro.

Além de perdas ósseas nos maxilares por causas locais acima mencionadas, temos a perda óssea fisiológica que ocorre devido ao avanço da idade e a induzida por alterações sistêmicas, como é o caso da osteoporose e do hipogonadismo.

Para reposição destas perdas ósseas, várias alternativas são citadas, tais como: enxertos ósseos (CHAVES et al., 2004; PERRI DE CARVALHO et al., 2002), células estromais da medula óssea (BMSC - bone marrow stromal cells) (PETTWAY et al., 2005), fatores de transformação de crescimento (TGFs (transforming growth factors)) (KATCHBURIAN, CERRI, 2002), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs (bone morphogenetic protein)) (KIRKER-HEAD et al., 1998; WOSNEY, 1999), biomateriais (MEINEL et al., 2005), enxertos de materiais aloplásticos (PERRI DE CARVALHO et al., 2002; GRANDI, 2007), bem como a associação destes nas reconstruções. Além disso,

medicamentos alopáticos (como Raloxifen) (BROULÍK, BROULÍKOVÁ, 2007), medicamentos homeopáticos (como *Symphytum officinallis*) (CHAVES et al., 2004), hormônios esteróides sexuais (como a Testosterona e os Estrógenos) (NOTELOVITZ, 2002; KASPERK et al., 1989), o hormônio da paratireóide e calcitonina (WONG, COHN, 1974; PETTWAY et al., 2005; PEREIRA, 1997), além da vitamina D₃ (ZANELLO, NORMAN, 2004), normalmente administrados de forma sistêmica, são relacionados à melhora ou aceleração da regeneração óssea.

1.1. ALTERNATIVAS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

1.1.1. Enxertos Ósseos

Os enxertos ósseos apresentam várias classificações. Uma delas é relacionada à diferença genética existente entre os organismos doadores e receptores, sendo classificados em autógenos/autólogos (quando compostos por tecido do próprio receptor), homógenos (obtidos de outro indivíduo da mesma espécie que o receptor) e heterógenos ou xenógenos (retirados de seres de uma espécie diferente do receptor) (FREITAS LEONEL et al., 2004).

Segundo PERRI DE CARVALHO et al. (2002), os substitutos ósseos são também classificados quanto ao seu mecanismo de ação em: osteocondutivos, osteoindutivos e osteogênicos. A *osteocondução* é caracterizada por neoformação óssea por aposição até o material, sendo exemplos de materiais osteocondutores em Implantodontia os aloplásticos e os heterógenos. Já o processo de *osteoindução* envolve a formação de novo osso a partir de células osteoprogenitoras, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas, que se diferenciam sob a influência de um ou mais agentes indutores. Os materiais homógenos e os autógenos são os agentes osteoindutores mais usados em Implantodontia. O osso autógeno é o único material de enxerto com propriedades osteogênicas. A *osteogênese* é um processo no qual o crescimento ósseo ocorre derivado de células viáveis transferidas dentro de um enxerto. O novo osso é regenerado pelos osteoblastos e pelas células que se originam na

medula, transferidas com o enxerto. O mecanismo do crescimento ósseo, dentro dos enxertos ósseos autógenos inclui as três fases: fase I- osteogênese, fase II- osteoindução e fase III- osteocondução.

Além disso, sabe-se que o osso apresenta potencial de regeneração e remodelação que pode ser manipulado usando-se enxertos com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Para a boa aceitação do enxerto no leito receptor, é necessário que a região ofereça irrigação sanguínea adequada, ausência de processos infecciosos e inflamatórios e proporcione estabilidade física ao material de enxerto (DAHLIN *apud* CHAVES et al., 2004).

Conforme MEINEL et al. (2005), grandes defeitos ósseos representam o maior problema em medicina regenerativa. O osso autólogo proveniente de outra localização anatômica, inserido no sítio do defeito, seria uma opção. Estes transplantes consistem de matriz óssea, células autólogas e fatores de crescimento armazenados na matriz e transportados com o implante. Entretanto, este procedimento apresenta desvantagens significantes, incluindo dor adicional, morbidade de um segundo sítio (doador), necessidade de reparo deste sítio e grande tempo de permanência do paciente no hospital para sua reabilitação.

1.1.2. Células Estromais da Medula Óssea (BMSC - Bone Marrow Stromal Cells)

PETTWAY et al. (2005) citam em seu estudo BMSC obtida através da cultura de células ósseas, como tendo grande potencial para formação de osso, mesmo em localizações ectópicas como na região dorsal subcutânea de camundongos, quando ali implantadas. Os ossículos ali formados, conforme os autores continham cortical óssea, osso trabecular, e medula hematopoiética.

1.1.3. Fatores de Transformação de Crescimento (TGFs – Transforming Growth Factors)

Conforme KATCHBURIAN e CERRI (2002), TGF é um dos fatores que controla a reabsorção óssea e age diretamente nos osteoblastos, estimulando-os a liberarem moléculas que sinalizam aos osteoclastos o início de sua atividade reabsortiva, estabelecendo uma relação parácrina entre osteoblastos e osteoclastos.

1.1.4. Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs - Bone Morphogenetic Protein)

Proteínas ósseas morfogenéticas são fatores de diferenciação que induzem transformação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos durante a embriogênese, crescimento, maioridade e cicatrização. Na vida pós-natal, proteínas ósseas morfogenéticas são distribuídas junto a fibras colágenas da matriz óssea humana, em células mesenquimais do estroma medular, nas células periostais, no germe dentário e nas células de condrossarcomas e osteosarcomas. Após fraturas, acredita-se que as proteínas ósseas morfogenéticas participem da difusão da reabsorção de matriz óssea e promovam osteogênese por ativação de células osteoprogenitoras para produzir mais proteínas ósseas morfogenéticas. Dos vários fatores de crescimento e diferenciação conhecidos, somente as proteínas ósseas morfogenéticas têm mostrado habilidade singular na formação de novo osso *in vitro* e *in vivo* (KIRKER-HEAD et al.,1998).

1.1.5. Biomateriais

Segundo MEINEL et al. (2005), a geração/regeneração óssea e estratégias de fixação óssea utilizam implantes de biomateriais, os quais são gradualmente substituídos por osso autólogo. Idealmente um biomaterial deve ser: biodegradável, osteocondutivo e apresentar força mecânica e integridade até que os tecidos novos formados possam manter sua função. Alguns biomateriais baseados em proteínas, como colágenos, são promissores devido a sua similaridade às proteínas naturais das superfícies ósseas, entretanto, apresentam reduzidas propriedades mecânicas.

Ainda conforme MEINEL et al. (2005), vários biomateriais biológicos e não biológicos têm sido estudados para preenchimento com relação a suas propriedades mecânicas, incluindo cerâmicas, metais, polímeros sintéticos e polímeros naturais. A principal diferença dos materiais baseados em proteínas com relação às opções sintéticas é o fato de que os primeiros refletem o papel natural de estruturas/fibras proteicas no remodelamento tecidual. Colágenos – como fonte de polímero natural – seriam de particular interesse como andaimes (“scaffolds”) para engenharia tecidual óssea e refletem a maior fonte de proteínas na matriz extracelular, a qual é constituída em mais de 90% por colágeno tipo I, além de outras proteínas da matriz. Por outro lado, os colágenos apresentam propriedades mecânicas insatisfatórias.

1.1.6. Enxertos de Materiais Aloplásticos

As desvantagens ou limitações do enxerto autógeno estimulam a busca por materiais alternativos, substitutos ósseos que mantenham ou auxiliem a capacidade regenerativa do tecido ósseo de forma relativamente inalterada, e os enxertos aloplásticos ou sintéticos vêm sendo apresentados como uma alternativa viável. O preenchimento de defeitos ósseos por enxertos aloplásticos é facilitado pela osteocondução, uma vez que o material fornece um suporte que guiará a formação óssea (GRANDI, 2007). Para isso, algumas condições devem

ser cumpridas: esse suporte deve ser constituído por um material bioinerte ou bioativo, sua forma e dimensões devem favorecer o crescimento ósseo pelo seu interior e a deposição óssea deve ocorrer por substituição (SHIRATORI et al., 2005).

É importante ressaltar que os materiais osteocondutores não têm capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem a falha, orientando as novas células originadas por proliferação das osteoprogenitoras, provenientes das margens do defeito, a promoverem a neoformação de tecido ósseo (COOK, RUEGER, 1996).

Dentre as vantagens encontradas nos enxertos aloplásticos, podem-se destacar a disponibilidade comercial em grande quantidade, características de fácil manipulação, além da possibilidade de uma integração física e/ou química no meio inserido (SANTOS, 2002).

O fosfato tricálcico e a hidroxiapatita são substitutos ósseos aloplásticos da classe das biocerâmicas que têm larga aplicação na área biomédica. Nos últimos anos, têm sido usados em cirurgias ósseas, apresentando uma série de vantagens na utilização em ortopedia e traumatologia, sendo as mais destacadas a biocompatibilidade e a bioatividade, que permitem a osteocondução dos tecidos, e o endurecimento *in situ*, o que oferece maior facilidade de manipulação e aplicação no caso de cimentos de fosfato de cálcio (LIKE, MONROE, 1991).

1.1.7. Medicamentos

Conforme BROULÍK e BROULÍKOVÁ (2007), Raloxifen é um modulador seletivo do receptor de estrógenos que previne a perda óssea em ratas ovariectomizadas. Eles comprovaram em seu estudo que Raloxifen também foi efetivo contra os deletérios efeitos da castração em ratos machos, com relação à conseqüente osteopenia induzida, o que suporta a hipótese de que os estrógenos podem ter efeitos fisiológicos no esqueleto de ratos machos.

Segundo CHAVES et al. (2004), o reparo e remodelação óssea também podem ser modulados por medicamentos alopáticos ou homeopáticos administrados tanto por via sistêmica quanto tópica. Dentre os medicamentos homeopáticos citam o *Symphytum officinallis*, conhecido como Confrei, indicado no tratamento de fraturas e de diferentes patologias ósseas.

1.1.8. Hormônios

1.1.8.1. Esteróides Sexuais

Por atividade androgênica direta e transformação em estrógenos (Es), os andrógenos modulam o ciclo de remodelação óssea. Os andrógenos também aumentam a massa muscular e a força e induzem fatores mecânicos que alteram o balanço entre reabsorção e formação, em favor da formação óssea. Tem papel importante aqui a interação entre vários esteróides sexuais – estrógenos e andrógenos - e as células envolvidas na remodelação óssea: os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (NOTELOVITZ, 2002). Conforme NOTELOVITZ (2002) concluiu em seu trabalho, os andrógenos diretamente ou via sua aromatização a estrógeno têm profunda influência na preservação do osso e da massa muscular. Uma vez que aumentam a massa e a força muscular, como resultado aumentando a atividade física, esta conduz à ativação de formação óssea local e à estimulação de células modulatórias da formação óssea - os osteócitos, levando-nos à conclusão de que a carga mecânica, quando combinada com terapia hormonal, resulta em aumento da resposta osteogênica e da densidade óssea mineral.

KASPERK et al. (1989) concluíram que os andrógenos estimulam diretamente a proliferação de células ósseas *in vitro* e, analisando sua ação em linhas de células osteoblásticas isoladas, que eles podem estimular a proliferação de células osteoblásticas humanas e de ratos, induzindo a expressão do marcador fosfatase alcalina (de diferenciação

de linha de osteoblastos), presumivelmente por um mecanismo mediado por um receptor de andrógenos. O trabalho mostra que a Testosterona (o maior andrógeno circulante), o methenolone (um anabólico esteróide) e a fluoxymesterone (um andrógeno sintético) igualmente estimulam a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) nas células ósseas de ratos. Conforme os autores, este é o primeiro estudo *in vitro* a demonstrar que andrógenos podem estimular diretamente células ósseas para proliferação e diferenciação (como mensurado pela atividade de fosfatase alcalina). Estas observações sugerem que o aumento da massa esquelética em sujeitos tratados com andrógenos pode ser relacionado a um efeito direto dos andrógenos na formação óssea.

Em alguns tecidos, a Testosterona é convertida em estrógenos, o que também colabora no controle da massa óssea. As observações dos autores confirmaram que fluoxymesterone, um andrógeno sintético, e DHT (dihidrotestosterona) não podem ser metabolizados em estrógenos. Por outro lado, o aumento da proliferação de células ósseas do rato sustenta a possibilidade de que a Testosterona seja convertida em estrógenos pelas células ósseas e exerça seus efeitos completos nos receptores de estrógenos presentes nas células ósseas humanas (KASPERK et al.,1989).

A atividade dos esteróides sexuais é influenciada por várias enzimas encontradas no osso. Como resultado, a Testosterona age tanto diretamente ou via sua aromatização para estradiol. A atividade dos andrógenos também varia com a superfície óssea: células periostais, por exemplo, não têm atividade de 5 α -redutase, indicando que a Testosterona é um metabólito ativo clinicamente importante neste local. Os andrógenos influenciam a função das células ósseas por via local ou sistêmica, através de fatores de crescimento ou citocinas sistêmicos. Pelo aumento da diferenciação de osteoblastos, os andrógenos regulam a produção de matriz óssea, a organização, e a mineralização. Os andrógenos também regulam a atividade e recrutamento de osteoclastos (NOTELOVITZ, 2002).

1.1.8.2. *Hormônio da Paratireóide (PTH) e Calcitonina*

Conforme WONG e COHN (1974), o crescimento e remodelação óssea dependem da deposição e reabsorção em nível local. O balanço entre estes dois processos é modulado pelos hormônios peptídicos PTH (hormônio da paratireóide) e calcitonina. O PTH tem sido demonstrado como indutor de reabsorção óssea, tanto *in vivo* como *in vitro*, e a calcitonina (CT) inibiria este processo.

Por outro lado, segundo PETTWAY et al. (2005), o hormônio da paratireóide (PTH) é um hormônio peptídico envolvido na homeostase do cálcio, tendo apresentado aumento da massa óssea quando administrado intermitentemente e promovido reabsorção óssea quando administrado continuamente.

PETTWAY et al. (2005) relatam que o PTH (hormônio da paratireóide) é utilizado em clínica para tratamento da osteoporose e tem sido altamente investigado para uma potencial utilização em engenharia tecidual, cicatrização de fraturas e integração de implantes, porém seus mecanismos de ação que estimulariam a formação óssea não estão esclarecidos.

PETTWAY et al. (2005), em seu trabalho, avaliaram a ação do PTH sistêmico (injetado subcutaneamente) sobre BMSC (bone marrow stromal cells), obtido através de cultura de células ósseas e implantado na região dorsal subcutânea de camundongos. Para a aplicação do BMSC, utilizaram esponjas de gelatina (Gelfoan[®]), às quais o BMSC foi incorporado por ação de capilaridade. Eles observaram a formação de ossículos ectópicos na região que recebeu implante de BMSC em Gelfoan. Estes ossículos continham cortical óssea, osso trabecular e medula hematopoiética. Os autores analisaram a mineralização/constituição destes ossículos ectópicos e sua relação com as aplicações de PTH que variaram nos grupos com relação ao tempo/início da administração do hormônio. Eles encontraram que a ação anabólica do PTH nos ossículos ectópicos foi temporariamente dependente do implante de BMSC e sugerem que a estratégia de implantação de células foi particularmente responsiva ao PTH.

Por outro lado, conforme PEREIRA (1997), a calcitonina participa significativamente da homeostase esquelética, através da regulação do processo de remodelação óssea, estabilizando ou aumentando o conteúdo mineral no osso cortical e medular. A elevação dos níveis plasmáticos de cálcio é o principal estímulo para secreção de calcitonina, no entanto, o grau de resposta observado em diferentes espécies está relacionado à sua necessidade de evitar o desenvolvimento de hipercalcemia.

A massa óssea diminui em pacientes com deficiência de calcitonina congênita ou adquirida, sugerindo uma participação do hormônio na conservação óssea. A calcitonina endógena torna-se importante quando o esqueleto é exposto a fatores que aumentam a reabsorção óssea, tais como excesso de paratormônio no hiperparatireoidismo primário, concluindo-se daí que a calcitonina é um antagonista fisiológico do paratormônio em relação ao cálcio, pois causa hipocalcemia. No entanto, em relação ao fosfato, possui o mesmo efeito hipofosfatêmico, independente da queda de cálcio. O fosfato que abandona o líquido extracelular provavelmente penetra no osso. Estes efeitos são devidos à inibição óssea osteoclástica e influência na função renal, causando natriúria, fosfatúria e calciúria (PEREIRA, 1997).

1.1.9. Vitamina D₃

ZANELLO e NORMAN (2004) relatam que $1\alpha,25(\text{OH})_2$ - Vitamina D₃ (1,25) modula a expressão gênica de osteoblastos das proteínas da matriz óssea via um receptor nuclear de vitamina D (VDR) e também gera modificações elétricas da membrana plasmática através de mecanismos rápidos não genômicos ainda não completamente entendidos.

1.2. FISIOLOGIA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

1.2.1. Ciclo da Remodelação Óssea

A remodelação óssea é um contínuo processo que ocorre para garantir a resistência óssea, através de uma combinação entre remoção de osso velho (reabsorção) com a síntese de novo osso (formação). Existem quatro passos distintos no ciclo de remodelação óssea que envolvem primariamente dois tipos de células: osteoclastos e osteoblastos. Na *ativação*, pré-osteoclastos são estimulados e diferenciados em osteoclastos maduros por uma variedade de citocinas e fatores de crescimento. Na *reabsorção*, uma substância “acidlike” é secretada na borda rugosa dos osteoclastos, dissolvendo, digerindo e absorvendo a matriz orgânica e minerais do osso velho. Na *reversão*, uma vez que a cavidade reabsorvida atinge pré-determinada profundidade, uma superfície de cimento, derivada de monócitos, cobre o defeito e previne nova erosão óssea. Finalmente, na *formação*, osteoblastos são atraídos para dentro da cavidade reabsorvida, e sob a influência de vários hormônios e fatores de crescimento, maturam e enchem a cavidade reabsorvida com “novo” osso. Existem dois estágios inter-relatados neste contínuo processo. O primeiro estágio envolve a síntese de matriz óssea, sendo que 90% desta é feita sobre colágeno tipo I. O osteóide recente formado é mineralizado com cristais de cálcio hidroxapatita. O outro estágio contém, além disso, traços de magnésio, potássio, sódio e carbonato. A vitamina D₃ (1,25 hidroxí D₃) é essencial para este processo. Na sua ausência, a mineralização será defeituosa e pode resultar em osteomalácia (NOTELOVITZ, 2002).

1.2.2. Resistência Mecânica e Remodelação Óssea

Bem pouco reconhecido é o ciclo de remodelação óssea e seu papel na força mecânica, bem como seu efeito modulando a atividade de osteócitos. A resistência mecânica (exercícios e gravidade) regula a qualidade da via óssea de estimulação dos osteócitos. Os osteócitos são derivados de linhagem de osteoblastos e produzem óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PG)E₂, e ambos são responsáveis pela osteogênese por modificarem a atividade de osteoblastos e osteoclastos (NOTELOVITZ, 2002).

1.2.3. Balanço Ósseo Negativo

A massa óssea é mantida quando as fases de reabsorção e formação são balanceadas, onde a quantidade de osso removido é repostada em igual quantidade por osso fresco. O balanço ósseo negativo resulta de duas situações: 1-alta atividade ou queda de osteoclastos e/ou um aumento do número de sítios de reabsorção ou 2- queda ou inadequada função de osteoblastos, com diminuída secreção de osteóide e uma inabilidade para preencher normalmente a cavidade reabsorvida (NOTELOVITZ, 2002).

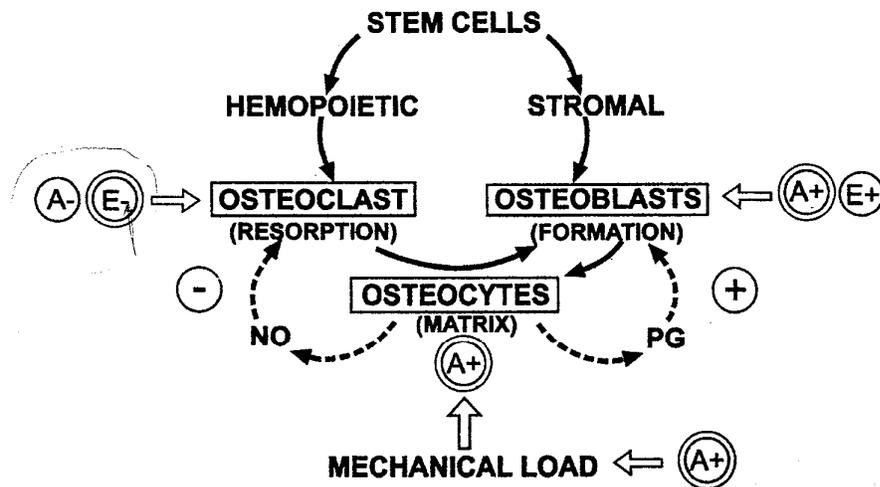
1.2.4. Osso Esponjoso X Osso Cortical

Os ossos esponjoso e cortical têm diferenças anatômicas, mas idênticos tipos celulares e similar ciclo de remodelação.

O osso cortical é primariamente encontrado em ossos longos de braços, pernas (esqueleto apendicular) e revestindo externamente as vértebras. O osso cortical tem três superfícies: 1- *envelope endosteal* - é a superfície que reveste a cavidade medular, 2 - *envelope periosteal* - é a outra superfície do osso, 3 -*envelope intracortical* - é o tecido ósseo entre endóstio e perióstio. Em adição à qualidade do osso, a força do esqueleto apendicular é dependente do diâmetro do osso e da largura da cortical. A remodelação óssea em crianças ocorre a partir do perióstio (aumento do diâmetro ósseo). Em adultos, perda óssea endosteal predomina, com estreitamento do envelope intracortical. O grau com que este processo ocorre na pré-menopausa tem impacto subsequente na força dos ossos longos e – junto com o grau de perda óssea fisiológica do osso cortical pós-menopausa – no eventual risco de fratura (NOTELOVITZ, 2002).

O osso esponjoso ou trabecular é encontrado principalmente nas vértebras e possui arranjo como lâminas verticais e horizontais semelhantes a favos de mel interconectadas. Isto assegura força mecânica. A remodelação óssea é realizada nos envelopes interior e exterior da lâmina trabecular. Excesso de remodelação óssea resulta em adelgaçamento, rarefação das lâminas, com eventual completa reabsorção da trabécula, queda de força mecânica e risco de fratura. A aguda queda de estrógeno (com um aumento da atividade de osteoclastos) tem como mais comum resultado a perfuração trabecular em mulheres, mais que em homens. Isto pode ser devido ao declínio vagaroso de andrógenos e sua conversão a estrógeno nos homens (NOTELOVITZ, 2002).

Bone remodeling, sex steroids, and mechanical loading. E, Estrogen; A, Androgen; NO, nitric oxide; +, stimulatory; -, inhibitory; PG, prostaglandin; double circle, primary activity; single circle, secondary activity. (From Smit and Burger (1). Reprinted by permission of the publisher.)



Notelovitz. Androgen effects on bone and muscle. Fertil Steril 2002.

Figura 01: Esquema da remodelação óssea, esteróides sexuais e resistência mecânica.
FONTE: NOTELOVITZ. Androgen effects on bone and muscle. Fertil Steril 2002.

1.2.5. Fatores que influenciam a homeostase óssea

Conforme KATCHBURIAN e CERRI (2002), diversas evidências apontam para um intercâmbio entre osteoclastos e osteoblastos/células de revestimento ósseo e osteócitos. Estudos *in vitro* têm demonstrado que os osteoclastos só exercem atividade reabsortiva na presença de osteoblastos. Assim, previamente à reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos, os osteoblastos/células de revestimento ósseo produzem collagenase, removendo a camada de osteóide, expondo a matriz mineralizada aos osteoclastos que se tornam ativos (funcionais) em contato direto com a matriz óssea mineralizada. A maioria dos fatores que controla a reabsorção óssea age diretamente nos osteoblastos, tais como: PTH (hormônio da paratireóide), 1,25- α dihidroxi vitamina D3, esteróides sexuais, prostaglandinas (PGs), citocinas (interleucinas-1, interleucina-6, interleucinas-11), fator de transformação de crescimento (TGF), entre outros. Portanto, estes fatores estimulam os osteoblastos a liberar moléculas que sinalizam aos osteoclastos o início de sua atividade reabsortiva, estabelecendo

uma relação parácrina entre osteoblastos e osteoclastos. Nos osteoclastos foram identificados receptores para o hormônio calcitonina. Estes fatores agem controlando a proliferação, diferenciação e a fusão dos precursores de osteoclastos.

O estrógeno também exerce influência sobre a atividade de reabsorção via osteoblastos, sendo que a sua deficiência estimula a reabsorção óssea. Mais recentemente, a apoptose de osteoblastos e osteócitos tem sido indicada como um possível mecanismo de sinalização para o início da atividade de reabsorção pelos osteoclastos. A apoptose é um tipo de morte celular programada que tem sido descrito como o principal mecanismo de “turnover” celular, importante para manter o equilíbrio populacional de células no tecido. No processo de apoptose, as células ativam uma série de moléculas intracelulares que promovem a morte celular. Em consequência da ativação de diversas enzimas promotoras de apoptose, a célula fragmenta-se, formando os corpos apoptóticos, sendo estes internalizados por macrófagos e células vizinhas. Diversos são os agentes que ativam as enzimas intracelulares promotoras de apoptose. No tecido ósseo, a deficiência de estrógeno tem sido associada com a morte celular de osteoblastos e osteócitos. As células ósseas em apoptose produziram moléculas sinalizadoras que atraíam os osteoclastos e, conseqüentemente, estimulariam a reabsorção óssea. Assim, o processo de reparação do tecido ósseo envolve uma série de interações célula-célula e moléculas-célula. Durante este processo, múltiplos fatores de crescimento e diferenciação atuam regulando as atividades celulares (proliferação, diferenciação e capacidade de síntese de componentes da matriz), guiando, assim, a reparação óssea. A ação destes fatores ocorre através de receptores de superfície celular. Estes diversos fatores influenciam a homeostase do tecido ósseo, bem como na regeneração/reparação do periodonto e na interação de implantes dentários com o osso alveolar (KATCHBURIAN, CERRI, 2002).

1.3. ANDRÓGENOS: FISIOLOGIA E EFEITOS NO OSSO

1.3.1. Metabolismo de Andrógenos e Estrógenos

O metabolismo primário de andrógenos e estrógenos é realizado em quatro lugares: no testículo, no ovário, no córtex adrenal, e no tecido adiposo, com adicionais contribuições do metabolismo de esteróides sexuais no músculo e cérebro (NOTELOVITZ, 2002).

A atividade dos esteróides sexuais é determinada por várias enzimas, muitas das quais são encontradas no osso. Estas enzimas incluem *atividade aromatase* (convertendo T a E₂ (Estradiol)); *17-β hidroxisteroide dehidrogenase* (controlando o “caminho” da androstenediona para T e, E₁ (Estrona) para E₂) e; *sulfatase*, a enzima que regula a sulfatação da Estrona. A Testosterona (T) é promovida à Dihidrotestosterona (DHT) pela enzima *5α-redutase*. Nas células periostais, não se detecta atividade de *5α-redutase*, indicando que a Testosterona pode ser um metabólito ativo neste sítio clinicamente importante. Os maiores andrógenos da glândula adrenal incluem sulfato de DHEA (DHEA-S) e androstenediona (A). Os esteróides androgênicos – diretamente ou por conversão a E₂ – medeiam as funções fisiológicas através da ligação andrógeno-receptor. Isto confirma que há um receptor específico para DHEA nos osteoblastos (NOTELOVITZ, 2002).

Os andrógenos podem afetar o esqueleto masculino tanto diretamente, através da ativação do receptor de andrógenos (AR), como indiretamente, através da estimulação dos receptores de estrógenos após aromatização. Em camundongos machos foi constatado que a ação da Testosterona mediada pelo receptor de andrógenos é essencial para formação periostal óssea e contribui para manutenção do osso trabecular (VANDENPUT et al., 2004).

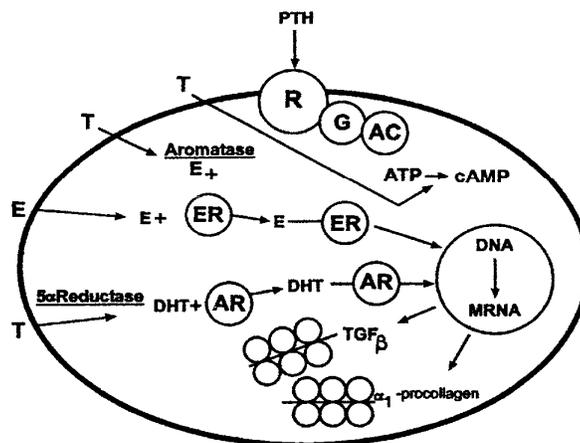
1.3.2. Receptores de Andrógenos em Células Ósseas

Receptores de andrógenos foram encontrados nas três células ósseas: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Estes receptores são similares a outros receptores esteroidais (estrógeno, progesterona, mineralocorticóides e glicocorticóides) e foram encontrados primariamente dentro do núcleo. Os receptores de andrógenos são mais expressados em osteoblastos e, em maior proporção, no osso cortical que no esponjoso. A expressão dos receptores de andrógenos é maior em culturas de osteoblastos de osso jovem quando comparada com osso senil. Estes receptores têm predominância de atividade nos osteoblastos dos sítios de formação óssea (NOTELOVITZ, 2002).

Os receptores de andrógenos no núcleo são responsáveis pela transcrição genômica clássica de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) de osteoblastos. Os andrógenos difundem-se livremente através da membrana plasmática até o núcleo e ligam-se aos receptores de andrógenos (ARs). Uma vez o complexo AR-ligando ativado, a metade protéica é liberada com a formação de um homodímero (ou possivelmente heterodímero, devido a relatos de duas isoformas de receptores de andrógenos protéicos em células osteoblásticas). Modulado por vários co-ativadores e co-repressores, o receptor de andrógenos liga-se ao DNA, influenciando a transcrição e translação de genes que governam a função dos osteoblastos. Isto é abundante tanto para receptores de andrógenos (AR) como para receptores de estrógenos nos osteoblastos, indicando o duplo papel da T e E na fisiologia normal do osso (NOTELOVITZ, 2002).

Os andrógenos podem regular a atividade dos osteoblastos pela transcrição genômica clássica de mRNA de osteoblastos através dos receptores de andrógenos no núcleo ou através de uma via mais rápida, um mecanismo não-genômico de receptores direto na superfície celular dos osteoblastos (NOTELOVITZ, 2002).

Putative mechanism of androgen action in the human female osteoblast. E, 17- β estradiol; ER, estrogen receptor; PTH, parathyroid hormone; R, pth receptor; G, G protein; AC, adenylate cyclase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate. (From Gasperino (17). Reprinted by permission of the publisher.)



Notelovitz. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril* 2002.

Figura 02: Esquema do mecanismo de ação de andrógenos em osteoblastos de fêmeas humanas.
FONTE: NOTELOVITZ. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril* 2002.

Receptores de andrógenos são também encontrados em células da medula óssea regulando a osteoclastogênese. A regulação dos esteróides sexuais na função osteoclástica é controlada primariamente por E_2 e pelo receptor de estrógeno. Uma possibilidade de efeito indireto da Testosterona (T) é através da aromatização para E_2 . Receptores de andrógenos foram encontrados em osteócitos enterrados na matriz óssea (NOTELOVITZ, 2002).

Têm sido identificados receptores específicos de ligação a andrógenos: T, DHT e DHEA. A extensão na qual T age diretamente ou via sua aromatização a E_2 não está esclarecida e pode variar com o polimorfismo dos receptores de andrógenos. Por outro lado, Dihidrotestosterona não sofre aromatização (NOTELOVITZ, 2002).

1.3.3. Fatores que controlam a expressão do receptor de andrógenos e a função dos osteoblastos

1.3.3.1. Proliferação de Osteoblastos

Receptores de andrógenos são “up-regulated” por andrógenos no osso e também por exposição a glicocorticóides, estrógeno e 1,25 hydroxy D₃. Os andrógenos estimulam a proliferação de osteoblastos, mas, sob condições experimentais, a exposição prolongada a andrógenos pode inibir a proliferação de células osteoblásticas significativamente. Por isso, a terapia intermitente com andrógenos melhora a densidade óssea mineral em mulheres, mais do que a terapia androgênica contínua (NOTELOVITZ, 2002).

1.3.3.2. Diferenciação de Osteoblastos

A exposição a andrógenos aumenta a diferenciação de osteoblastos e a síntese de proteínas na matriz extracelular, tanto como colágeno tipo 1 α 1, osteocalcina e osteonectina. Isto é refletido por um aumento na dose-resposta na atividade de fosfatase alcalina específica do osso. Os andrógenos também estimulam a mineralização. Em síntese, andrógenos parecem ter uma importante função na regulação da organização e produção de matriz óssea (NOTELOVITZ, 2002).

1.3.3.3. Micro-ambiente Ósseo

Os andrógenos também influenciam a função de células ósseas através de seus efeitos no local ou de fatores sistêmicos que controlam o micro-ambiente das células ósseas. Os andrógenos têm um profundo efeito no fator de transformação de crescimento (TGF) β , o qual é um dos mais potentes mitógenos de osteoblastos. A Dihidrotestosterona medeia aumentos de atividade de TGF- β para via TGF- β 2, mas outras isoformas podem estar envolvidas. Tanto DHT quanto T regulam para cima a síntese de TGF- β . Nesta forma latente, TGF- β é armazenado no osso, funcionando como um meio de reserva do corpo para este fator de crescimento. Outros sistemas de fatores de crescimento são possivelmente influenciados por andrógenos (DHT), incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento símile a insulina (IGF) II. O segundo efeito é causado por um aumento de afinidade no ligando de IGF-II e não por um aumento na quantidade média de IGF-I ou IGF-II na cultura de osteoblastos. Andrógenos também diminuem a gênese de osteoclastos por inibição na produção de Interleucina-6 (IL-6) no estroma de células do osso medular. Isto resulta em maturação e desenvolvimento diminuído de osteoclastos. Testosterona e DHT também regulam a atividade de osteoclastos por inibição, tanto do hormônio da paratireóide e IL-1 quanto estimulando produção de PGE₂ (Prostaglandina E₂) (NOTELOVITZ, 2002).

NOTELOVITZ (2002) concluiu que os esteróides sexuais estão diretamente envolvidos na modulação da osteogênese, no metabolismo e na função do músculo. Neste contexto, pode-se concluir que andrógenos – tanto diretamente ou via aromatização a estrógeno- têm influência profunda na preservação do osso e na força e massa muscular.

1.4. TESTOSTERONA

A Testosterona é um hormônio esteróide sintetizado e secretado nos machos pelas células intersticiais ou células de Leydig, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH), também chamado hormônio estimulador das células intersticiais (ICSH) (HAKOLA et al., 1998). É sintetizada a partir do colesterol nas células de Leydig e também a partir da androstenediona secretada pelo córtex supra-renal (GANONG, 2000). Devido à proximidade existente entre as células de Leydig e as células de Sertoli dos túbulos seminíferos, há uma relação parácrina entre elas, pois as células de Sertoli e as células peritubulares são as células-alvo primárias da Testosterona. O padrão de secreção da Testosterona pelas células de Leydig segue o padrão de liberação pulsátil característico do LH (HAKOLA et al., 1998).

O principal efeito descrito para os hormônios andrógenos está relacionado à transcrição da informação genética no RNA mensageiro. Este efeito é mediado por um receptor androgênico intracelular (iAR), que pertence à superfamília de receptores de esteróides nucleares (KUMAR, TINDAL, 1998; BEATO, KLUG, 2000). O iAR ativo liga-se à Testosterona no citoplasma e a transporta até o núcleo, onde o hormônio ligar-se-á ao elemento responsivo a andrógenos nos genes promotores alvo, causando, em última análise, ativação ou repressão da transcrição genética (KUMAR, TINDAL, 1998). Os andrógenos possuem outras ações, as quais, como descreveu SELYE (1941), caracterizam-se por curta latência (segundos) e uma rapidez de resposta que sugere uma ação direta do esteróide sobre a membrana plasmática, o que McEWEN et al. (1978) denominou “efeito não-genômico”.

LIEBERHERR e GROSSE (1994), avaliando em seu trabalho a ação de andrógenos sobre o osso, encontraram um rápido efeito da Testosterona sobre o cálcio livre citosólico e o metabolismo de fosfolípidios da membrana em osteoblastos de ratos machos. Estes efeitos foram produzidos por concentrações fisiológicas. Segundo elas, a Testosterona desencadeia um transitório aumento no (Ca^{2+}), acompanhado pela manutenção de uma fase platô.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar histologicamente a ação da Testosterona utilizada de forma tópica sobre o tecido ósseo de ratos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Obtenção de registros histológicos da ação da Testosterona tópica sobre o tecido ósseo e sua relação com o tempo durante o qual foi instituído o tratamento.
- Avaliar as alterações provocadas nas células ósseas e se ocorre aceleração na neoformação óssea.
- Avaliar aspectos relacionados ao processo de cicatrização:
 - a- presença de inflamação
 - b- formação de tecido conjuntivo fibroso
 - c- neoformação óssea nos defeitos criados
 - d- neoformação óssea na região medular
- Comparação entre os grupos de animais que foram castrados ou não e entre os que receberam o hormônio ou não.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciências Básicas da Saúde-
Departamento de Fisiologia – Campus Centro - Porto Alegre, RS, Brasil.

3.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:

O presente projeto passou por avaliação da Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A parte experimental somente teve início após aprovação do projeto por esta Comissão e, apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.3. AMOSTRAGEM

Para o presente estudo foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus* variação *Albinus rodentia mammalia*, cepa Wistar), provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, machos com peso médio de 300g, idade pós-natal de aproximadamente três meses, alimentados com água e ração *ad libitum*, mantidos em temperatura ambiente.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, onde 15 foram castrados e os outros 15 não. Nestes grupos de 15, os animais foram novamente divididos em três subgrupos de cinco ratos cada, onde num subgrupo foi aplicado Propionato de Testosterona (PT) em uma das patas e na outra Óleo Mineral (OM), sendo sacrificados em 30 dias de pós-operatório. O segundo subgrupo recebeu o mesmo tratamento, porém os animais foram sacrificados em 15 dias de pós-operatório. O terceiro subgrupo recebeu esponja de colágeno (EC) em uma das patas e na outra apenas foi realizada a perfuração (P), sem colocação de nenhum material, sendo sacrificados em 15 dias pós-operatórios. Os mesmos tratamentos e subgrupos foram realizados no grupo não-castrado. Tanto o Propionato de Testosterona quanto o Óleo Mineral foram introduzidos nos defeitos ósseos utilizando-se esponja de colágeno (Gelfoan(G)), embebida com estas substâncias. Quanto à escolha das patas, foi realizada randomização quanto à pata de cada rato em que seria aplicado o PT e àquela em que apenas seria aplicado o OM, e assim sucessivamente. Para identificar-se a pata em que foi aplicado o PT ou apenas a EC, a orelha do lado correspondente à pata foi perfurada.

Grupo Experimental: Esponja de Colágeno/ Gelfoan (EC/G)+Propionato de Testosterona (PT) e Esponja de Colágeno/Gelfoan (EC/G)+ Óleo Mineral (OM).

Grupo Controle: Perfuração (P) e Gelfoan/Esponja de Colágeno (EC/G).

Abaixo segue o esquema da randomização das patas dos animais quanto à realização de um ou outro tratamento (quadros 1 e 2):

Quadro 01: Esquema da randomização das patas dos animais conforme o tipo de substância a ser aplicada. Grupo dos ratos castrados.															
Grupo dos Ratos Castrados															
Subgrupos															
Material Aplicado	Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral 30 dias					Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral 15 dias					Esponja de Colágeno ou Perfuração 15 dias				
PT/EC(G) OM/Perfuração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D

FONTE: Dados Metodológicos do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

Quadro 02: Esquema da randomização das patas dos animais conforme o tipo de substância a ser aplicada. Grupo dos ratos não castrados.															
Grupo dos Ratos Não Castrados															
Subgrupos															
Material Aplicado	Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral 30 dias					Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral 15 dias					Esponja de Colágeno ou Perfuração 15 dias				
PT/EC(G) OM/Perfuração	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D

FONTE: Dados Metodológicos do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

Analisando o esquema de randomização observa-se que o rato 1 foi castrado e recebeu aplicação de Propionato de Testosterona na esponja de colágeno na pata esquerda (E) - observando-se o rato de frente - e Óleo Mineral na esponja de colágeno na pata direita (D), sendo o animal sacrificado 30 dias após. Já o rato 11, este também castrado, recebeu aplicação de Gelfoan (esponja de colágeno) na pata esquerda e apenas teve uma perfuração óssea na pata direita e assim sucessivamente. Da mesma forma isto foi repetido com o grupo dos ratos não castrados.

A esponja de colágeno utilizada, que apresenta entre outros nomes comerciais, Gelfoan[®], é definida na literatura como: “compostos de colágeno utilizados como esponjas degradáveis, que depois de umedecidos, têm uma apresentação gelatinosa, sendo utilizados em várias áreas da medicina, entre elas: Otorrinolaringologia (como suporte-base para os enxertos nas cirurgias otológicas), Neurocirurgia (no estancamento do gotejamento da dura-máter sob os bordos do osso), Odontologia (em curativos após extrações dentárias), Dermatologia (em curativos em cirurgia por abrasão de pele e queimaduras, biópsias cutâneas e incisões pequenas sem suturas), Ginecologia (em biópsias por contato) e em outros procedimentos cirúrgicos, como auxiliar na obtenção de hemostasia” (DORNELLES et al., 2003).

Ainda conforme a literatura, Gelfoan[®] apresenta-se sob a forma farmacêutica de esponja hemostática de gelatina, cuja composição é esponja estéril de gelatina absorvível de pele de animais. É definido como uma esponja cirúrgica, dobrável e esterilizada, capaz de absorver e de manter em suas malhas muitas vezes seu peso em sangue total. Quando implantada em tecidos é completamente absorvida dentro de quatro a seis semanas sem acarretar formação excessiva de tecido cicatricial. Quando aplicada em áreas hemorrágicas da mucosa vaginal, retal, nasal ou da pele, se liquefaz completamente dentro de 2 a 5 dias (DORNELLES et al., 2003).

Conforme ROHANIZADEH et al. (2008), a esponja de gelatina devido a sua flexibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade tem um potencial para ser usada como andaime para suporte de osteoblastos e para promover regeneração óssea em áreas defeituosas, principalmente em grandes defeitos ou quando o metabolismo ósseo não é hábil para reparar um defeito, como nos casos de osteoporose e doença de Paget.

Graças a estas características, a esponja de colágeno foi escolhida como meio para aplicação tópica e manutenção do Propionato de Testosterona junto à região a ser avaliada, uma vez que absorvendo líquido muitas vezes a mais que o seu peso total, pode absorver o Propionato de Testosterona e ir liberando o hormônio aos poucos, à medida que se processa a sua degradação.

A Testosterona escolhida foi sob a forma farmacêutica de Propionato de Testosterona, que apresenta como veículo óleo mineral. O Propionato de Testosterona foi escolhido por suas características de lenta liberação.

3.4. CASTRAÇÃO DOS RATOS

Utilizando uma técnica limpa mas não estéril, foi feita uma incisão na ponta do escroto, grande o suficiente para permitir a extrusão do testículo. Uma única ligadura é feita ao redor dos vasos espermáticos internos, dos vasos deferentes e ductos deferentes. Os testículos, em conjunto com o epidídimo, são excisados. A sutura é então realizada (FARRIS, GRIFFTH, 1949).

O procedimento foi realizado sob indução anestésica conforme descrito no procedimento cirúrgico nas tíbias, item 3.5.

Passadas duas semanas da castração, os animais foram submetidos à intervenção nas tíbias.

3.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NAS TÍBIAS

Sob indução anestésica com a associação de Anasedan¹ (Cloridrato de Xilazina a 2,3%), marca Vetbrands® (um relaxante muscular) e Dopalen² (Cloridrato de Ketamina a 10%), marca Vetbrands® (um anestésico geral), preparada na proporção 1:1 e administrada na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal, via intraperitoneal, foi realizada a seguinte técnica cirúrgica nos animais:

- Posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre uma mesa plana de trabalho.
- Tricotomia nas faces internas das duas patas traseiras.
- Assepsia do campo operatório com Povidine®.
- Montagem de campos cirúrgicos.
- Incisão longitudinal em pele e tecido subcutâneo na região entre a parte proximal e o corpo da tíbia.

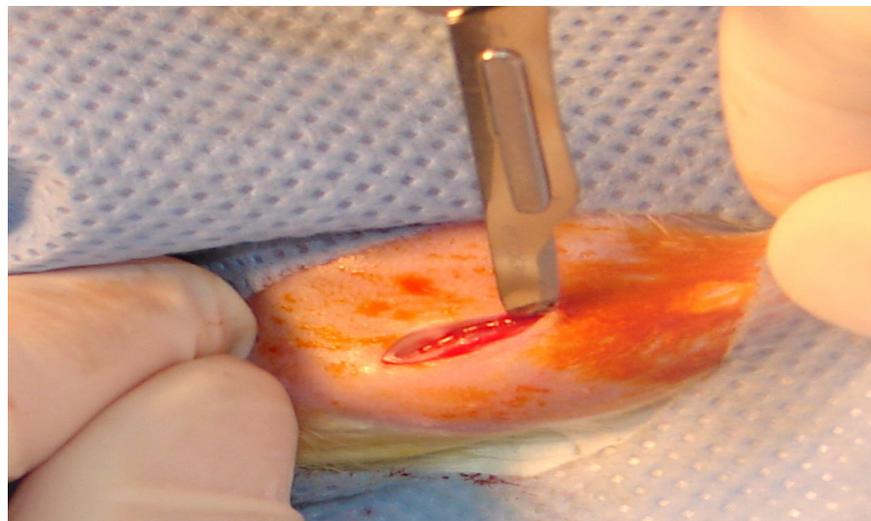


Figura 03: Incisão longitudinal em pele e tecido subcutâneo.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

1. Anasedan®, Agribrands Brasil Ltda, www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Anasedan_Pet.pdf

2. Dopalen®, Agribrands Brasil Ltda, www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Dopalen.pdf

- Descolamento do retalho.
- Afastamento do músculo Tríceps Sural.

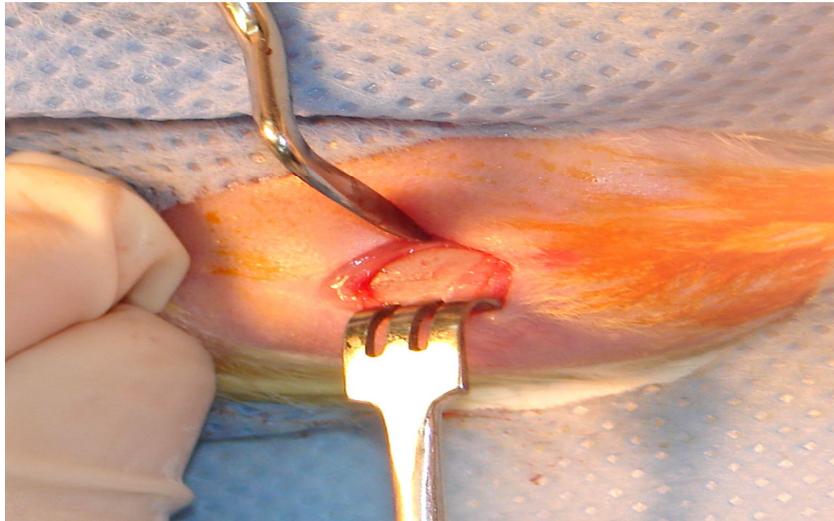


Figura 04: Após o descolamento e afastamento do retalho, visão da região onde será realizada a perfuração.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

- Perfuração na parte superior-lateral da tíbia, 10 mm abaixo do joelho com broca especialmente desenhada para o experimento em baixa rotação (800 rpm), utilizando motor elétrico e peça reta, com irrigação constante de soro fisiológico, com o objetivo de evitar o aquecimento do sítio cirúrgico.

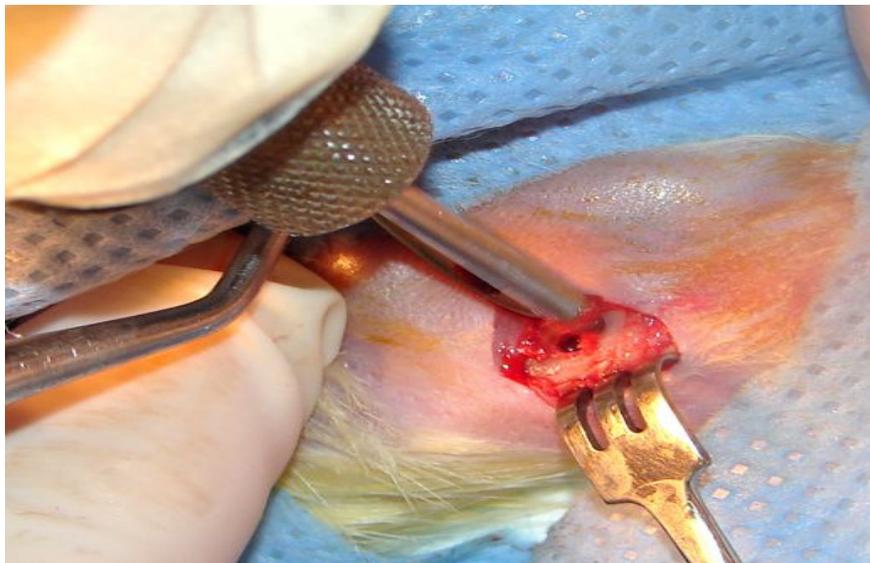


Figura 05: Perfuração óssea com broca específica para o experimento, 10 mm abaixo do joelho do animal, em motor elétrico de baixa rotação.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

- A broca a ser utilizada foi especialmente desenhada e confeccionada para o experimento, sendo de aço rápido helicoidal com ponta ativa cônica de 120°, comprimento de 1,5mm e diâmetro de 1,5mm, com stop para limitar a penetração à 1,5mm de profundidade. Foi projetada pela autora do projeto juntamente com o engenheiro mecânico responsável pela confecção de material cirúrgico da Empresa PROMM LTDA.



Figura 06: Broca utilizada para criar os defeitos ósseos nas tíbias.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

- O objetivo desta perfuração é remover a cortical óssea externa, criando uma cavidade que abranja a cortical e a medula óssea abaixo desta, sem atingir a cortical oposta.
- Curetagem da cavidade óssea com cureta compatível para remoção do osso esponjoso.



Figura 07: Curetagem da cavidade com cureta compatível para remoção de tecido ósseo esponjoso/medular, bem como da poeira óssea proveniente da perfuração executada com a broca.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

- Irrigação da cavidade com soro fisiológico
- Aplicação do Propionato de Testosterona ou Óleo mineral no tecido ósseo:
- Foi aplicada embebendo-se pequenos cubos de Gelfoan previamente cortados na seguinte dimensão: 1mm x 1mm com 1,5 microlitros de Propionato de Testosterona na dose $\cong 0.1$ ng ou 1,5 microlitros de óleo mineral, conforme a pata do animal. Estes cubos foram depositados na cavidade óssea.

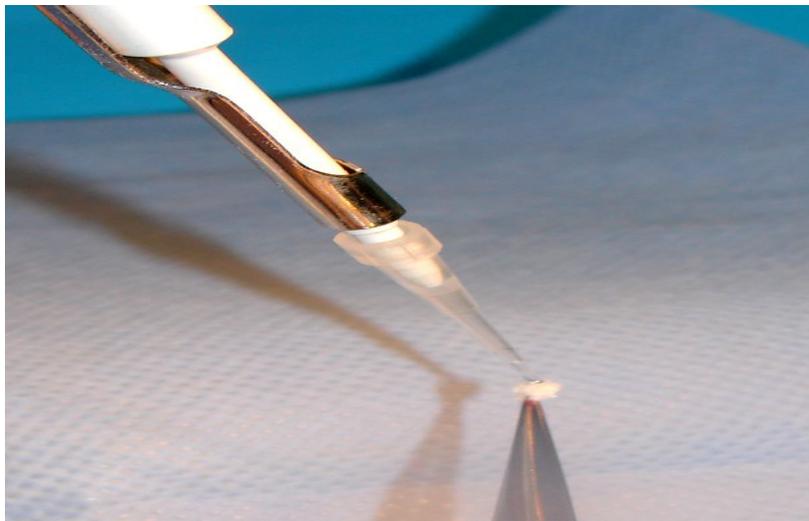


Figura 08: Pipeta medindo a substância a ser aplicada e sua colocação no Gelfoan antes da introdução na cavidade.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.



Figura 09: Introdução do Gelfoan com o Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral no defeito ósseo criado cirurgicamente, utilizando pinça compatível.
FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

- Foi realizada a aproximação dos bordos da ferida cirúrgica e sutura a pontos isolados com fio mononylon 4-0.

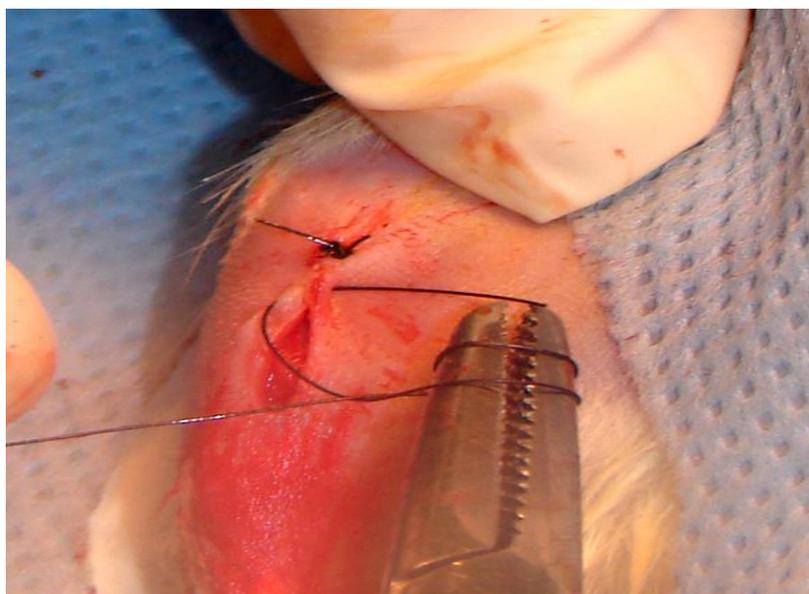


Figura 10: Sutura a pontos isolados.
FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

- O instrumental utilizado nas duas patas de um mesmo rato foi o mesmo.
- No pós-operatório, foi reaplicado o PT ou OM sempre na mesma pata, em 15 dias pós-operatórios para os ratos dos grupos a serem sacrificados em 30 dias. Os animais dos grupos de 15 dias receberam apenas uma aplicação que foi realizada no momento da perfuração óssea. Nas patas onde foi aplicado apenas o Gelfoan, este foi substituído por novo cubo, e nas patas onde foi feita apenas a perfuração foi realizada em 15 dias pós-operatórios nova incisão e exposição da cavidade, porém sem nova perfuração.
- Com relação à dose quinzenal de Propionato de Testosterona, citada anteriormente, foi a utilizada no experimento piloto deste projeto, porém, de acordo com a resposta obtida poderá vir a ser modificada.

Os ratos foram mantidos em gaiolas separadas conforme seu subgrupo.

Os animais foram sacrificados após inalação em câmara de CO_2 , do CREAL/ UFRGS, conforme descrito na amostragem: 5 animais de cada grupo aos 15 e 30 dias pós-operatórios, considerando-se como primeiro dia pós-operatório o dia seguinte ao da cirurgia.

Ambas as tíbias foram dissecadas e cortadas com disco de diamante de dupla face com intensa irrigação, sendo fixadas em formol neutro a 10%, identificando-se os grupos pelo tempo de acompanhamento pós-operatório, se foi aplicado Propionato de Testosterona ou não, bem como se o animal havia sido castrado.

Após a dissecação e antes de serem colocadas no formol, foi realizado o exame macroscópico das peças operatórias, bem como sua documentação fotográfica.

Os animais foram descartados em sacos plásticos e enviados para incineração, conforme protocolo do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS.

3.6. INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

As peças foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 6% em temperatura ambiente, por 48 horas. Após secção no sentido longitudinal, na região central do defeito ósseo (figura 11), as metades foram incluídas em parafina, no sentido paralelo ao corte, submetidas aos procedimentos laboratoriais rotineiros, cortadas em micrótomo de 4 μm de espessura e coradas em hematoxilina-eosina.

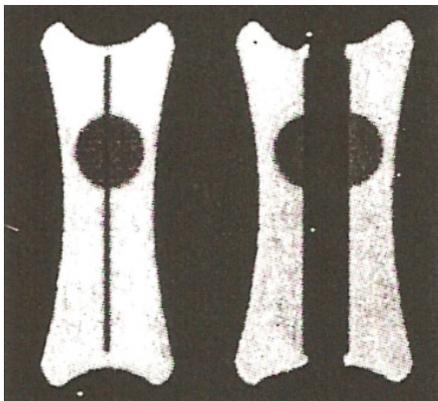


Figura 11: Esquema do corte das tíbias. As peças foram seccionadas no sentido longitudinal do osso. **FONTE:** CHAVES et al., 2004.

As análises morfológica descritiva/comparativa (CHAVES et al., 2004) e descritiva utilizando método semi-quantitativo (FREITAS LEONEL et al., 2004) foram realizadas a partir de imagens obtidas em microscopia de luz (Microscópio Jena-Med Carl Zeiss).

Foi realizada codificação das lâminas para que o examinador desconheça a qual grupo pertence a lâmina observada, durante a leitura.

Calibração do examinador: foram selecionadas aleatoriamente 30 lâminas. Foi procedida a leitura das lâminas e os dados foram anotados em fichas padronizadas (ver Apêndice A). Após uma semana de intervalo, foi realizada nova leitura das mesmas lâminas pelo examinador do trabalho. As mesmas 30 lâminas foram então lidas por um segundo examinador (Orientador), e os dados anotados. Para validação da concordância entre as leituras, realizou-se a aplicação do teste de Kappa. Não havendo diferenças estatisticamente significantes entre as observações intra e interexaminadores, estará assegurada a reprodutibilidade de aferição, sendo então a análise do conjunto das lâminas realizada por um único examinador.

A partir destas observações, foram executadas as análises histológicas descritiva/comparativa e descritiva/semi-quantitativa das imagens obtidas das lâminas com o uso de máquina digital Nikon Culpix 4500 acoplada a microscópio de luz Olympus Ax 70 com aumento de 40X, por um Patologista Veterinário especializado em avaliação de tecido ósseo.

Na avaliação histológica descritiva/comparativa, foi procedida a descrição de lâmina a lâmina, seguida da comparação dos eventos encontrados nos grupos, conforme suas formas de tratamento, castração ou não e tempo de sacrifício.

Logo após, foi realizada a avaliação descritiva por método semi-quantitativo, baseado no conhecimento dos aspectos histológicos relativos à normalidade comparados com os achados nas lâminas do experimento. Para tanto foram utilizadas fichas padronizadas (conforme Apêndice A).

3.6.1. Aspectos Histológicos Avaliados no Método Semi-quantitativo

Para determinação do comportamento do Propionato de Testosterona durante a neoformação tecidual, alguns parâmetros foram verificados. Estes basearam-se na presença de células características do processo inflamatório, na formação de cápsula fibrosa ao redor do material implantado, no tipo de tecido neoformado na região do defeito criado bem como na região medular, durante os períodos observados.

1) A inflamação foi classificada, de acordo com sua intensidade em:

- ausente (+), quando na ausência de células inflamatórias;
- moderada (++), devido à existência de algumas células inflamatórias dispersas em meio a área de estudo;
- severa (+++), devido à existência de grupamentos compostos por várias células inflamatórias junto ao material de estudo/cavidade cirúrgica.

2) A formação de tecido conjuntivo fibroso composto exclusivamente por fibras colágenas ao redor do material implantado e/ou na cavidade também foi avaliada. Este tecido é conhecido como cápsula fibrosa e visa isolar os corpos estranhos dos tecidos vivos. A verificação da cápsula fibrosa foi considerada como:

- ausente (+), quando o Gelfoan e/ou tecido ósseo neoformado estava em contato com tecido ósseo antigo ou tecido conjuntivo denso, composto por fibras e células;
- presente em algumas regiões (++), quando a cápsula fibrosa era encontrada em menos da metade do perímetro referente à interface entre o Gelfoan/tecido ósseo neoformado e o leito receptor;
- presente ao redor de todo o Gelfoan/tecido ósseo neoformado (+++), isolando-os assim do leito ósseo receptor.

3) A avaliação da neoformação óssea nos defeitos criados foi classificada como:

- ausente (+), quando não foi encontrado nenhum sinal de formação de tecido ósseo na área estudada (cavidade);
- incompleta (++) , quando verificou-se na região a formação de um tecido ósseo imaturo, rico em osteócitos;
- completa (+++), quando da formação de um tecido ósseo estruturado, do tipo lamelar, na região.

4) Um fato não esperado observado na avaliação descritiva foi a presença de formação óssea na região medular das tíbias, abaixo das cavidades. Osso este que não é característico da região medular e que aparecia muitas vezes envolvendo ou substituindo completamente o Gelfoan que também foi observado nesta região. Assim, a neoformação óssea na região medular foi avaliada e classificada como:

- ausente (+), quando não foi encontrado nenhum sinal de formação de tecido ósseo na medular ;
- incompleta (++) , quando verificou-se na região, a formação de um tecido ósseo imaturo, rico em osteócitos;
- completa (+++), quando da formação de um tecido ósseo estruturado, do tipo lamelar, na região.

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIÇÃO DA OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS

Após a morte dos animais e a remoção de suas tíbias, foi possível observar macroscopicamente o padrão de ossificação dos defeitos ósseos, em cada período de observação, e comparar os grupos experimentais com o grupo controle, de forma descritiva, como segue.

4.1.1. Análise Macroscópica . 15 dias – Animais Castrados

Aos 15 dias, no grupo controle onde foi aplicado apenas Gelfoan ou realizada a perfuração, observa-se no grupo da Perfuração, formação óssea preenchendo o defeito e no grupo do Gelfoan, um preenchimento parcial com tecido mole, sugerindo haver formação óssea abaixo do tecido mole (figura 12).

Já no grupo experimental observa-se preenchimento total da cavidade por osso no grupo que recebeu PT e G, e no grupo que recebeu OM e G há a formação de uma grande fibrose, que não só recobria o defeito em si, mas também o tecido ósseo circunvizinho. Removida esta grande fibrose, observa-se preenchimento por tecido mole da cavidade (figura 13).

4.1.2. Análise Macroscópica . 15 dias – Animais Não Castrados

Aos 15 dias, nos animais não castrados, observa-se completa ossificação das cavidades, tanto nas patas que receberam apenas perfuração quanto naquelas onde foi aplicado Gelfoan, porém a ossificação foi maior nas patas que foram apenas perfuradas (figura 14).

No grupo experimental observa-se fibrose recobrando as cavidades tanto nas patas tratadas com G mais PT, quanto nas tratadas com G mais OM. Esta fibrose abrange as cavidades e recobre o tecido ósseo circunvizinho, porém é menor no grupo do Propionato de Testosterona que no do Óleo Mineral (figura 15). Quanto à fibrose dos grupos tratados com Óleo Mineral, comparando-se os animais castrados e não castrados, sacrificados em 15 dias, pode-se dizer que a fibrose do grupo castrado é bem maior em extensão que a do grupo não castrado, em relação ao tecido ósseo circunvizinho.

4.1.3. Análise Macroscópica . 30 dias – Animais Castrados

No grupo experimental observa-se completa ossificação e desaparecimento dos limites da cavidade nas patas tratadas com Gelfoan mais Propionato de Testosterona (este tecido ósseo formado é semelhante ao tecido ósseo adjacente). Já no grupo que recebeu Gelfoan e Óleo Mineral, observa-se tecido ósseo preenchendo totalmente a cavidade, mas esta ainda apresenta limites definidos, e nas proximidades da cavidade há a presença de fibrose, porém em quantidade bem menor que a observada nos outros grupos do Óleo Mineral até agora (figura 16).

Para este período observatório, não foi realizado grupo controle.

4.1.4. Análise Macroscópica . 30 dias – Animais Não Castrados

Em ambas as cavidades experimentais, os defeitos mostram grande quantidade de osso neoformado, e diminuição do diâmetro das cavidades, porém no grupo tratado com Gelfoan mais Óleo Mineral há discreta fibrose recobrindo a cavidade (figura 17).

Não foi realizado grupo controle para este período de observação.

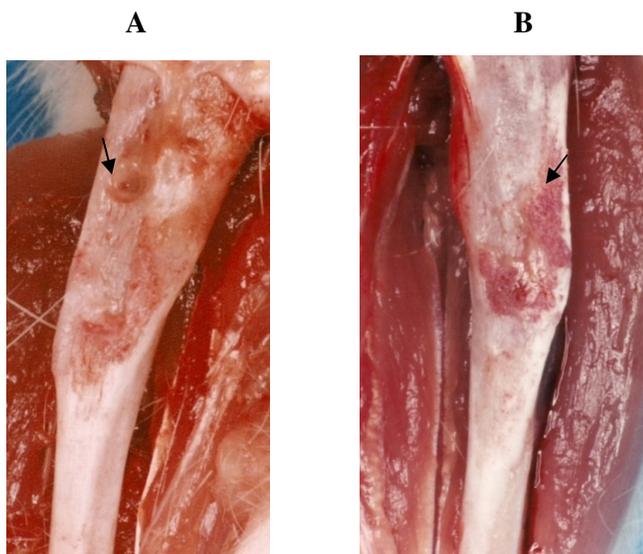


Figura 12: Peças operatórias do Grupo Controle: grupos Gelfoan (A) e Perfuração (coágulo de sangue) (B) – 15 dias - Animais Castrados. Observa-se no grupo do Gelfoan preenchimento parcial da cavidade com tecido mole, porém há formação óssea abaixo do tecido mole, e em B ossificação preenchendo a cavidade.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

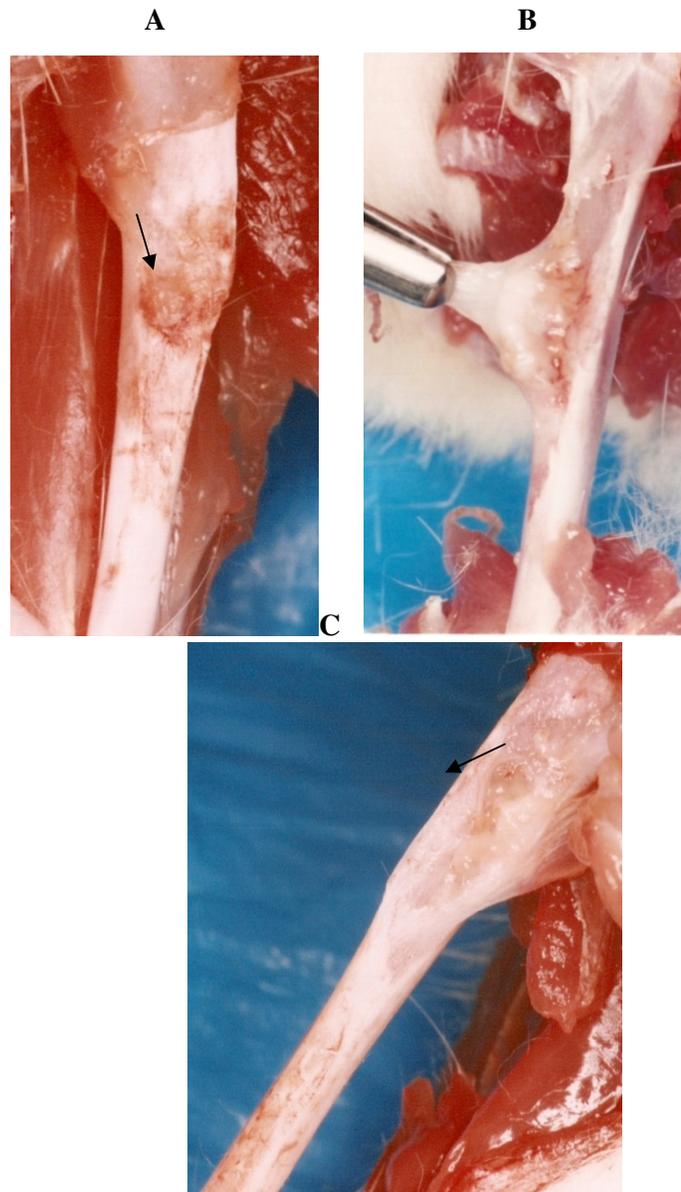


Figura 13: Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B e C) – 15 dias - Animais Castrados. Observa-se no grupo experimental preenchimento total da cavidade no grupo que recebeu Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A). No grupo que recebeu Gelfoan mais Óleo Mineral observa-se formação de grande fibrose recobrendo a cavidade (B). Em (C), após a remoção desta fibrose, verifica-se a cavidade preenchida por tecido mole.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

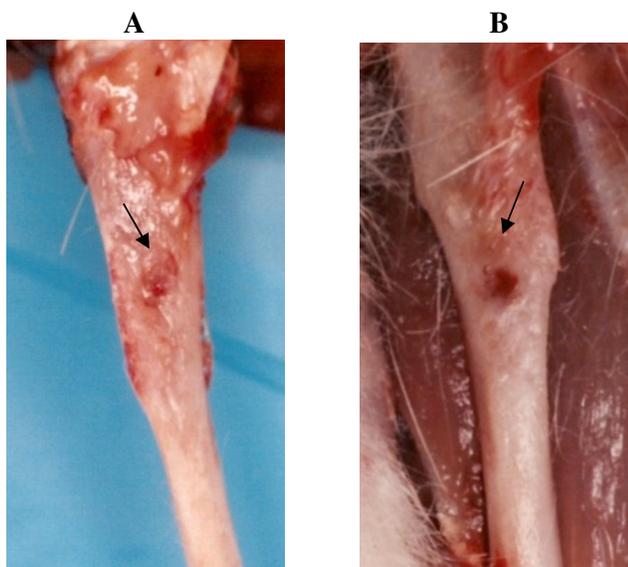


Figura 14: Peças operatórias do Grupo Controle: grupos Gelfoan (A) e Perfuração (preenchimento por coágulo de sangue) (B) – 15 dias - Animais Não Castrados. Observa-se completa ossificação nas cavidades de ambos os tratamentos, porém os achados sugerem que a ossificação é maior no grupo que recebeu apenas a perfuração.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

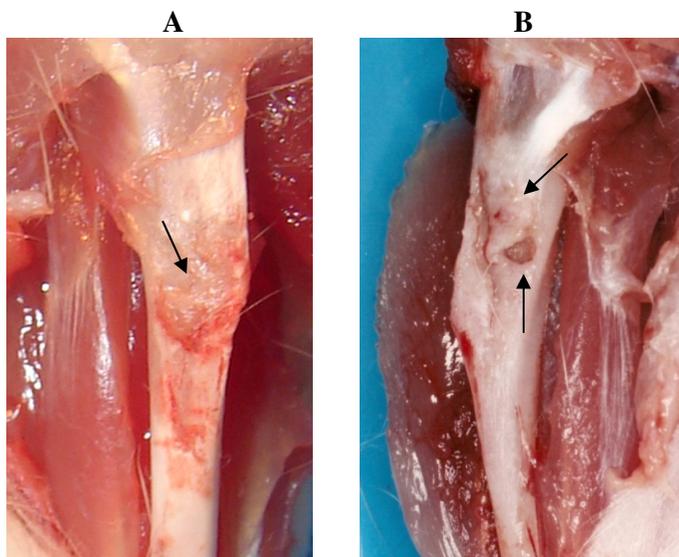


Figura 15: Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 15 dias - Animais Não Castrados. No grupo experimental observa-se fibrose recobrendo as cavidades tanto nas patas tratadas com Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A), quanto nas tratadas com Gelfoan mais Óleo Mineral (B). Esta fibrose abrange as cavidades e recobre o tecido ósseo circunvizinho, porém é menor no grupo do Propionato de Testosterona que no do Óleo Mineral.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

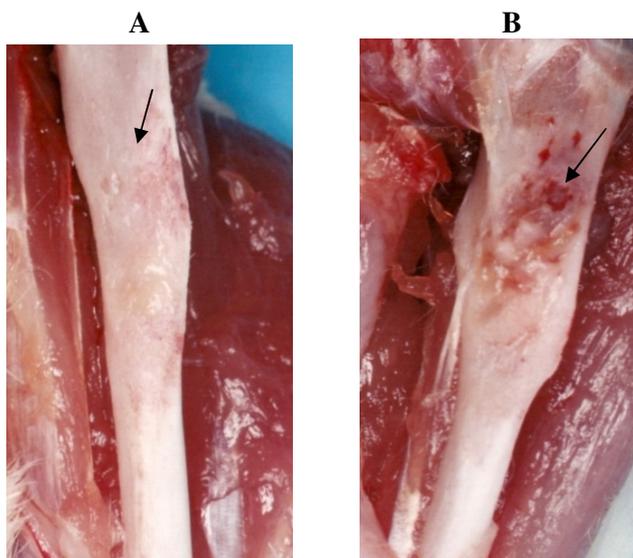


Figura 16: Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 30 dias - Animais Castrados. Observa-se completa ossificação e desaparecimento dos limites da cavidade nas patas tratadas com Gelfoan mais Propionato de Testosterona (o tecido ósseo formado é semelhante ao tecido ósseo adjacente) (A). No grupo com Gelfoan e Óleo Mineral, há tecido ósseo preenchendo totalmente a cavidade, observar nas proximidades da cavidade a presença de fibrose.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

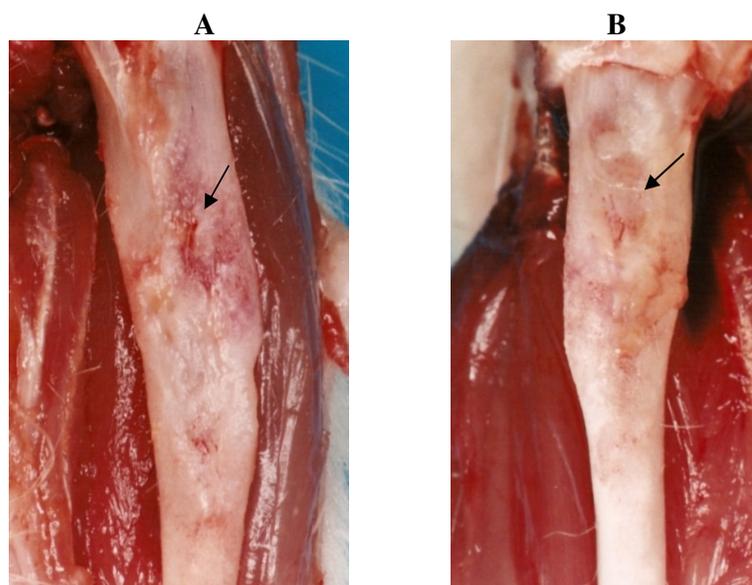


Figura 17: Peças operatórias do Grupo Experimental: grupos Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 30 dias - Animais Não Castrados. Observa-se em ambos os grupos grande quantidade de osso neoformado nos defeitos, e diminuição do diâmetro das cavidades, porém no grupo tratado com Gelfoan mais Óleo Mineral há discreta fibrose recobrendo a cavidade.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS,2007.

4.2. DESCRIÇÃO DA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS E DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

A avaliação histológica dos eventos ocorridos foi feita de forma descritiva, utilizando-se dois métodos: primeiramente, a descrição lâmina a lâmina e a comparação dos grupos conforme suas formas de tratamento e tempo de sacrifício.

Logo após, foi realizada avaliação utilizando-se um método semi-quantitativo, baseado no conhecimento dos aspectos histológicos relativos à normalidade comparados com os achados nas lâminas do experimento. Para ambas as análises foi empregado microscópio óptico de luz.

4.2.1. Avaliação Histológica Descritiva/Comparativa

4.2.1.1. Grupo Castrado tratado com G X Grupo Castrado que recebeu apenas Perfuração Óssea (preenchimento por coágulo de sangue), ambos sacrificados aos 15 dias pós-operatórios

No grupo que recebeu apenas Gelfoan, observa-se neoformação óssea entre as paredes corticais, significando cicatrização do defeito e não reação ao Gelfoan. Além disso, também se observa reação com formação óssea ao redor do Gelfoan, porém isto ocorre mais na região medular das tíbias.

Já no grupo que teve apenas a perfuração realizada, a cicatrização óssea observada foi normal, com formação de osso entre as paredes corticais do defeito, sendo o grupo que melhor cicatrizou, com a melhor neoformação óssea dos casos analisados.

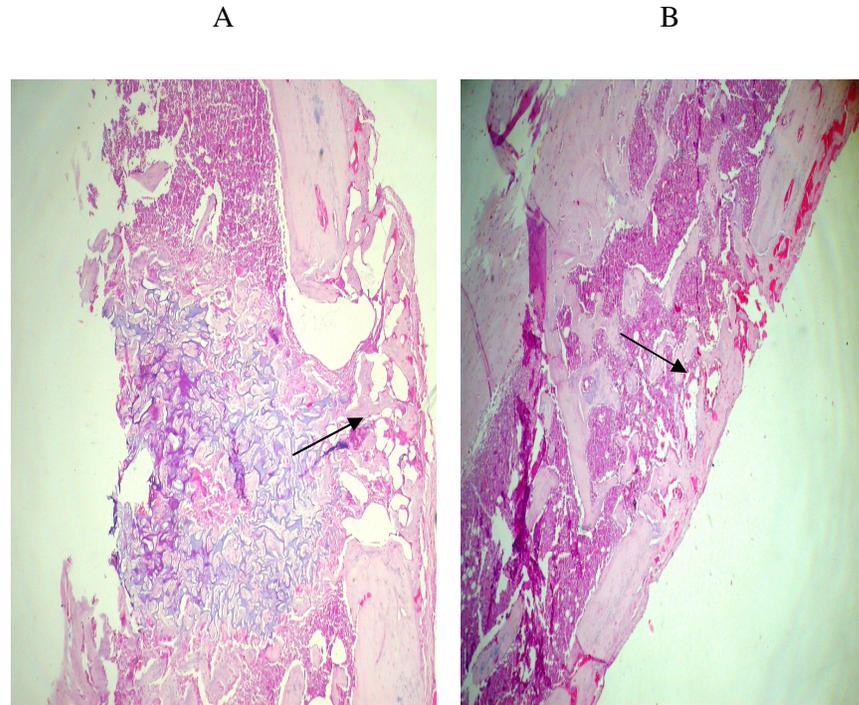


Figura 18: Grupo Controle: Gelfoan (A) e Perfuração (coágulo de sangue) (B) – 15 dias - Animais Castrados. Observa-se em ambos os grupos neoformação óssea entre as corticais, significando cicatrização do defeito. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

4.2.1.2. Grupo Castrado tratado com G+PT X Grupo Castrado tratado com G+Óleo Mineral, ambos sacrificados aos 15 dias pós-operatórios

Observa-se no grupo do Propionato de Testosterona neofomação óssea entre as corticais e também ao redor do Gelfoan, independente da localização deste. O osso formado ao redor do Gelfoan não tem relação com a cicatrização das cavidades. No grupo do Óleo Mineral, o osso observado está relacionado com o Gelfoan, como se fosse uma reação ao Gelfoan, independente da cicatrização das cavidades, que na verdade não ocorreu.

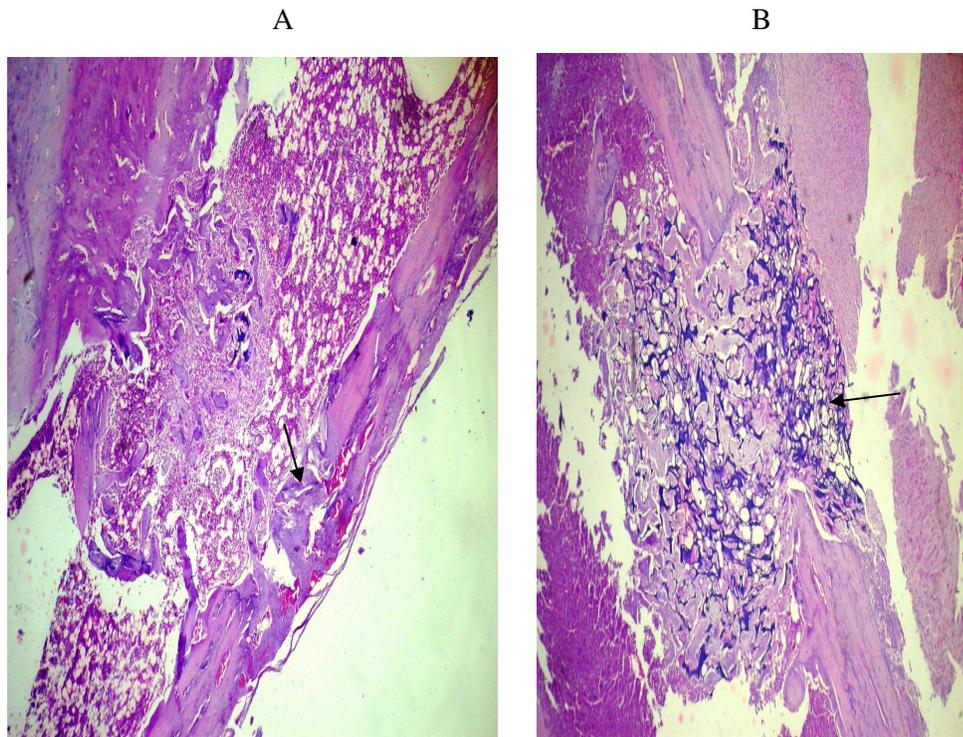


Figura 19: Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 15 dias - Animais Castrados. Observa-se formação óssea entre as corticais e também ao redor do Gelfoan no grupo que recebeu Gelfoan® mais Propionato de Testosterona (A). No grupo que recebeu Gelfoan mais Óleo Mineral (B) não observa-se cicatrização do defeito, apenas formação óssea reacional ao redor do Gelfoan que encontra-se localizado tanto entre as corticais quanto na região medular. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

A reação de formação óssea ao redor da esponja de colágeno ocorreu nas três formas de tratamento (G, G+PT e G+OM), porém ela foi mais intensa ao redor do G+PT e G+OM do que nos casos que receberam apenas aplicação de G.

4.2.1.3. Grupo Não Castrado tratado com G X Grupo Não Castrado que recebeu apenas Perfuração Óssea (preenchimento por coágulo de sangue), ambos sacrificados aos 15 dias pós-operatórios

No grupo do Gelfoan, observa-se muita reação a esponja de colágeno com osso e tecido conjuntivo ao redor do Gelfoan, porém, em algumas lâminas, o Gelfoan foi encontrado na medular, em outras, dentro da cavidade e, por fim, em outras, sobre a cavidade, tendo este osso formado ao redor do Gelfoan penetrado na cavidade, porém sem significar cicatrização do defeito ósseo.

No grupo da perfuração, observa-se formação óssea entre as corticais, denotando cicatrização do defeito. Não observa-se nenhum tipo de reação com formação de tecido conjuntivo nestas cavidades.

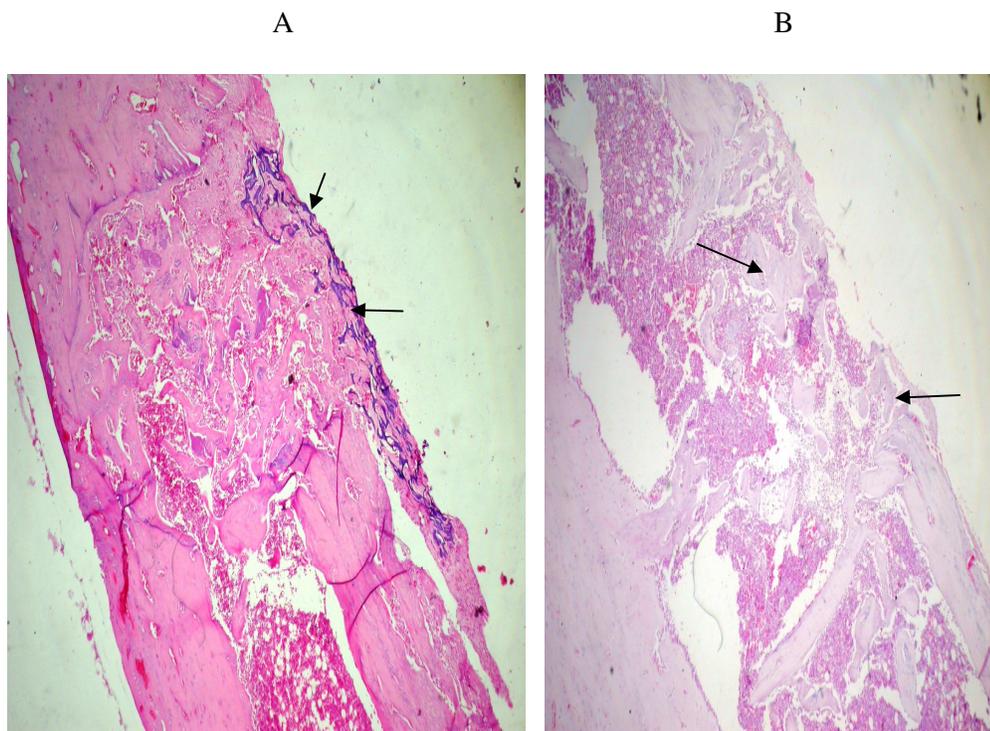


Figura 20: Grupo Controle: Gelfoan (A) e Perfuração (coágulo de sangue) (B) – 15 dias - Animais Não Castrados. Observa-se em (A) o Gelfoan localizado na medular, entre as corticais e sobre a cavidade com grande reação óssea ao seu redor, porém sem cicatrização do defeito. Em (B), cicatrização do defeito com formação óssea entre as corticais. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

4.2.1.4. Grupo Não Castrado tratado com G+PT X Grupo Não Castrado tratado com G+Óleo Mineral, ambos sacrificados aos 15 dias pós-operatórios

Observa-se que, no grupo tratado com Propionato de Testosterona, a formação óssea está apenas relacionada ao Gelfoan, envolvendo-o, sem apresentar relação com o osso das paredes da cavidade. Este osso neoformado é uma reação exclusiva ao Gelfoan. No grupo do Óleo Mineral, também observa-se osso neoformado entre as corticais, porém não relacionado a elas, bem como osso ao redor do Gelfoan em outras lâminas.

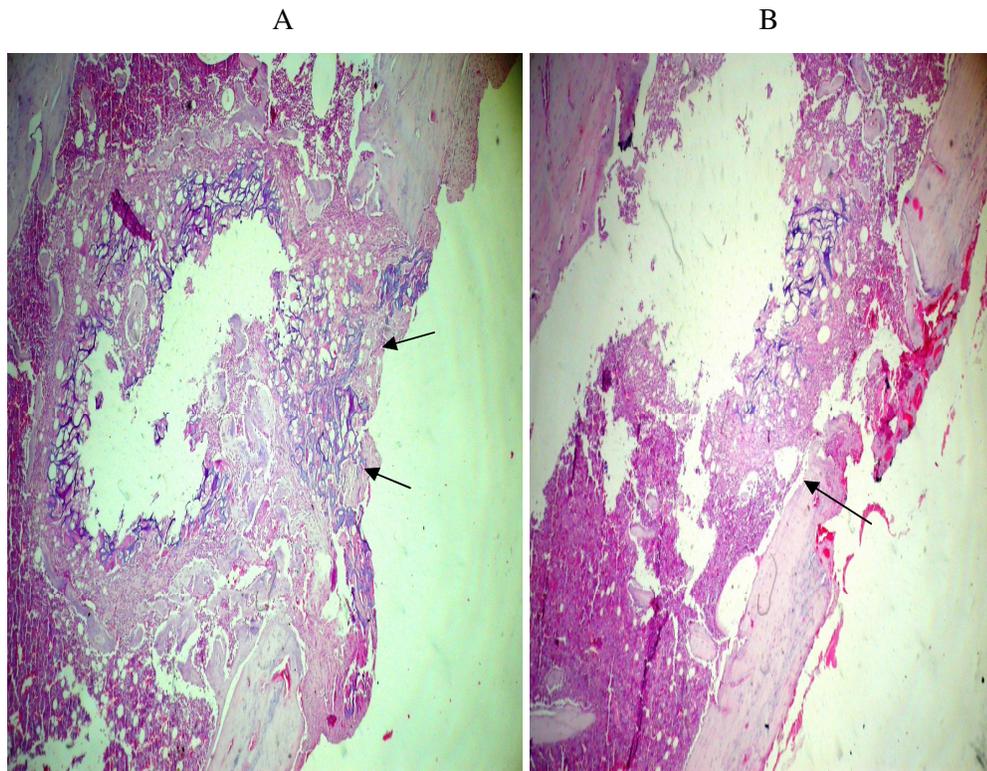


Figura 21: Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 15 dias - Animais Não Castrados. Não observa-se formação óssea entre as corticais, apenas ao redor do Gelfoan no grupo que recebeu Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A). No grupo que recebeu Gelfoan mais Óleo Mineral observa-se formação óssea entre as corticais, mas não relacionada a elas, ou seja, não houve cicatrização do defeito criado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

4.2.1.5. Grupo Castrado tratado com G+PT X Grupo Castrado tratado com G+Óleo Mineral, ambos sacrificados aos 30 dias pós-operatórios

Em ambos os grupos observa-se formação óssea entre as paredes corticais do defeito, denotando início de cicatrização óssea da cavidade, porém o Gelfoan é encontrado sobre a cavidade com grande reação ao seu redor, tanto com formação de tecido conjuntivo quanto de osso. Os dois grupos são bastante similares histologicamente.

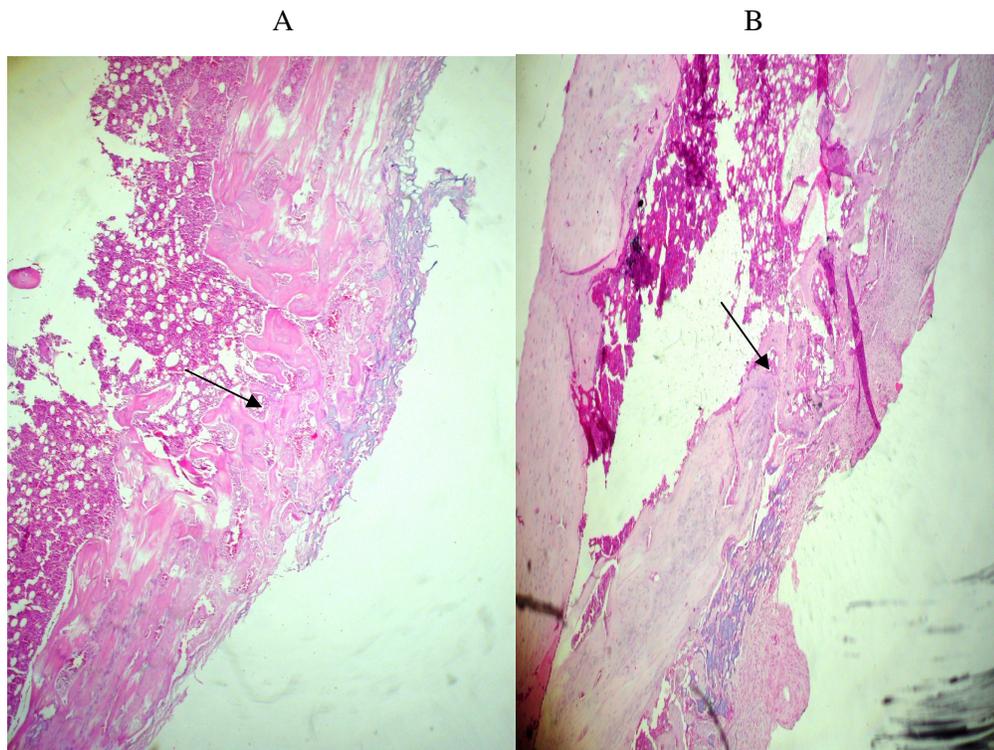


Figura 22: Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 30 dias - Animais Castrados. Os dois grupos são semelhantes quanto à neoformação óssea entre as corticais. O Gelfoan é observado sobre a cavidade com grande reação óssea e de tecido conjuntivo ao seu redor. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

4.2.1.6. Grupo Não Castrado tratado com G+PT X Grupo Não Castrado tratado com G+Óleo Mineral, ambos sacrificados aos 30 dias pós-operatórios

Embora tenham sido observadas variações entre as lâminas de um mesmo grupo, a neoformação óssea apresenta-se semelhante entre as duas formas de tratamento. Observa-se em algumas lâminas de ambos os grupos entre as corticais ósseas (local de realização do defeito ou cavidade óssea) presença de osso, porém em quantidade reduzida. Em outras lâminas, presença de osso localizada especificamente ao redor do Gelfoan, que em alguns casos estava entre as corticais e, em outros, localizado na região medular das tíbias. Não observa-se diferenças entre os dois tratamentos executados com relação à neoformação óssea.

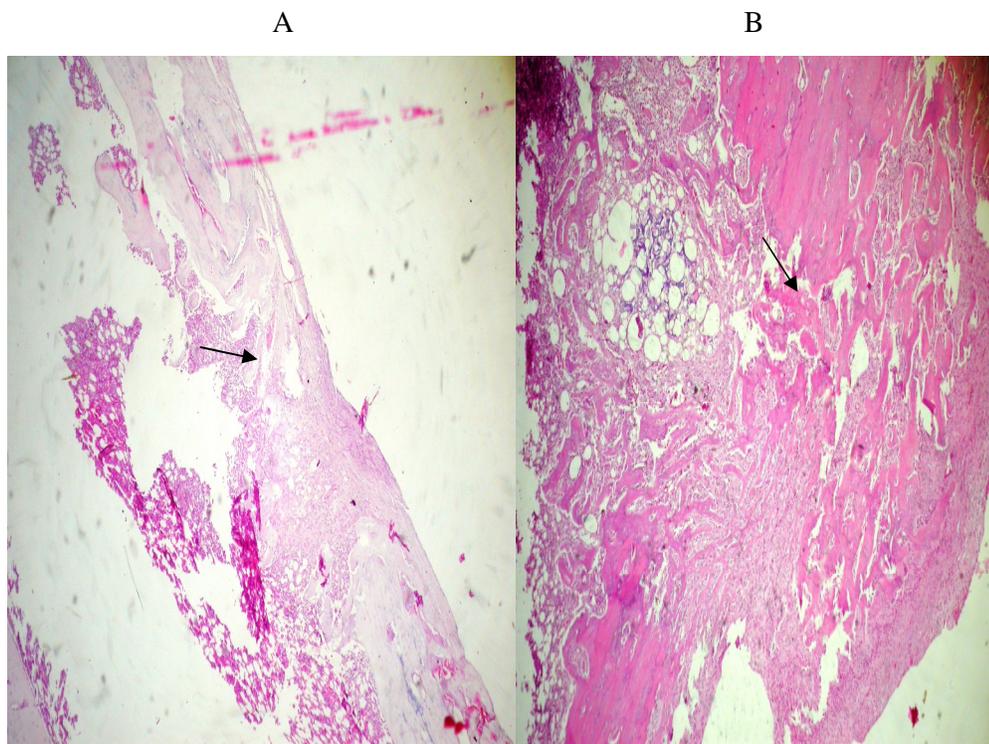


Figura 23: Grupo Experimental: Gelfoan mais Propionato de Testosterona (A) e Gelfoan mais Óleo Mineral (B) – 30 dias - Animais Não Castrados. Os dois grupos são semelhantes com neoformação óssea entre as corticais, porém em pequena quantidade, e o Gelfoan é observado dentro da cavidade e na região medular com grande reação óssea ao seu redor. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Documentação Fotográfica do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

4.2.2. Avaliação Histológica: Método Semi-quantitativo

Avaliação dos parâmetros histológicos utilizados para a determinação da eficácia do Propionato de Testosterona na aceleração da neoformação óssea. Para tanto, o Patologista baseou-se nos aspectos relativos à normalidade, já descritos na item 3.6.1. Aspectos Histológicos Avaliados no Método Semi-quantitativo.

TABELA 01: Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.

4.2.2.1. Ratos Castrados 15 dias

Características Analisadas	G	P	G+PT	G+OM
Inflamação	++	+	++	++
Cápsula Fibrosa	+++	++	+++	+++
Neoformação óssea na cavidade	++	+++	++	+
Neoformação óssea na medular	++	++	++	++

Identificação dos Grupos: **G**- grupo Gelfoan/Espunja de Colágeno; **P**- grupo Perfuração; **G+PT**- grupo Gelfoan + Propionato de Testosterona; **G+OM**- grupo Gelfoan + Óleo Mineral.

FONTE: Documentação do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

Comparando-se os tratamentos instituídos nos ratos castrados aos 15 dias pós-operatórios, observa-se a presença de algumas células inflamatórias em todos os tratamentos, com exceção da Perfuração, onde não foi introduzida nenhuma substância nas cavidades

criadas. Quanto à neoformação óssea, esta foi maior e melhor no grupo da Perfuração comparada com os demais grupos, onde G+PT e apenas G apresentaram cicatrização semelhante, com formação de osso imaturo. Já G+OM teve o pior resultado, com ausência de formação óssea na cavidade.

TABELA 02: Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais castrados sacrificados aos 30 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.

4.2.2.2. Ratos Castrados 30 dias

Características Analisadas	G	P	G+PT	G+OM
Inflamação			+	+ ++
Cápsula Fibrosa			++	++
Neoformação óssea na cavidade			+++	++
Neoformação óssea na medular			++	++

Identificação dos Grupos: **G**- grupo Gelfoan/Esponja de Colágeno; **P**- grupo Perfuração; **G+PT**- grupo Gelfoan + Propionato de Testosterona; **G+OM**- grupo Gelfoan + Óleo Mineral.

FONTE: Documentação do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

Entre os grupos G+PT e G+OM observa-se um melhor resultado no grupo do Propionato de Testosterona, uma vez que este apresentou ausência de inflamação e maior neoformação óssea na cavidade, com formação de tecido ósseo estruturado, tipo lamelar. O grupo do Óleo Mineral se dividiu, com algumas lâminas apresentando ausência de inflamação, embora outras tivessem presença de algumas células inflamatórias e, com relação à neoformação óssea, apresentava osso em menor quantidade, sendo um tecido ósseo imaturo, rico em osteócitos.

TABELA 03: Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais não castrados sacrificados aos 30 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.

4.2.2.3. Ratos Não Castrados 30 dias

Características Analisadas	G	P	G+PT	G+OM
Inflamação			++	++
Cápsula Fibrosa			++	++
Neoformação óssea na cavidade			++	++
Neoformação óssea na medular			++	++

Identificação dos Grupos: **G**- grupo Gelfoan/Espunja de Colágeno; **P**- grupo Perfuração; **G+PT**- grupo Gelfoan + Propionato de Testosterona; **G+OM**- grupo Gelfoan + Óleo Mineral.

FONTE: Documentação do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

No grupo dos não castrados sacrificados aos 30 dias, observa-se resultados semelhantes entre os grupos do Óleo Mineral e do Propionato de Testosterona, com ausência de inflamação e formação de tecido ósseo imaturo.

Comparando-se o grupo dos animais castrados com o dos não castrados sacrificados aos 30 dias pós-operatórios, observa-se que em ambos houve formação óssea, porém os melhores resultados estão no grupo dos castrados, onde no grupo do Propionato de Testosterona houve formação de osso estruturado, tipo lamelar e nos demais grupos observou-se formação de osso imaturo. Nota-se também que a presença de inflamação é contrária a neoformação óssea, ou seja, nos animais tratados que apresentavam inflamação a neoformação óssea estava reduzida, e naqueles com ausência de inflamação havia formação

de osso maduro. Os demais parâmetros observados apresentaram-se semelhantes entre as duas formas de tratamento e entre animais castrados e não castrados.

TABELA 04: Análise histológica semi-quantitativa comparando os grupos de animais não castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e os tratamentos instituídos.

4.2.2.4. Ratos Não Castrados 15 dias

Características Analisadas	G	P	G+PT	G+OM
Inflamação	++	+	++	++
Cápsula Fibrosa	++	+	++	+
Neoformação óssea na cavidade	++	++	+	+
Neoformação óssea na medular	++	++	++	++

Identificação dos Grupos: **G**- grupo Gelfoan/Espunja de Colágeno; **P**- grupo Perfuração; **G+PT**- grupo Gelfoan + Propionato de Testosterona; **G+OM**- grupo Gelfoan + Óleo Mineral.

FONTE: Documentação do Experimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS, 2008.

Comparando-se os diferentes tratamentos a que foram submetidos os animais não castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios, observa-se a presença de algumas células inflamatórias e cápsula fibrosa em todos os tratamentos, com exceção da Perfuração. Já a neoformação óssea na cavidade foi semelhante nos grupos G e P, com presença de osso imaturo, e ausência de cicatrização nos grupos G+PT e G+OM.

5. DISCUSSÃO

Conforme SCHLEGEL et al. (2006), métodos de reconstrução óssea são essenciais pré-requisitos para reabilitação funcional em regiões atróficas de perdas ósseas traumáticas nos maxilares. Transplantes ósseos autógenos de sítios intra ou extra orais são usados para regeneração de defeitos ósseos na região craniofacial, porém, devido à morbidade dos enxertos autógenos, substitutos ósseos têm sido utilizados.

Para obter dados clínicos seguros sobre materiais substitutos ósseos, um adequado modelo de teste é requerido para que tenha reprodutibilidade de resultados e comparabilidade das amostras. Um pré-requisito para este modelo é não apresentar regeneração óssea espontânea completa ocorrendo durante o tempo de vida dos animais nos defeitos criados. Desta maneira, o defeito é definido como defeito de tamanho crítico e foi inicialmente descrito por Schmitz e Hollinger e colegas. Proposta prática com o intuito de que, se a regeneração óssea não é completa após 52 semanas, a regeneração nunca será completa. Estudos têm demonstrado que a cicatrização ou ausência de regeneração óssea depende da localização do defeito, do tamanho do defeito, da espécie e da idade do animal. Com a criação de pequenos defeitos de um lado só (defeitos não críticos) ou com a seleção de animais com elevada taxa metabólica (ex. camundongos) tem-se uma regeneração espontânea do defeito via resposta fisiológica normal. A escolha da correta dimensão do defeito representa o mais importante critério para aplicabilidade do modelo teste. Devido aos vários processos de regeneração, é também importante se o defeito criado foi monocortical ou bicortical (ambos defeitos críticos dependendo de suas dimensões). Em adição, deve-se ressaltar que a regeneração do defeito inicia a partir de suas bordas, e lá está o potencial de regeneração da base cortical remanescente quando são usados defeitos monocorticais (SCHLEGEL et al., 2006).

Baseados nestes dados, optamos pela realização de defeitos monocorticais (críticos, ou seja, que não podem cicatrizar totalmente) para execução de nosso experimento. Utilizamos também ratos albinos, que apresentam elevada taxa metabólica. Com isso poderia-se esperar acelerada regeneração das cavidades, porém não total regeneração, pois o objeto de nosso estudo era avaliar a neoformação óssea, bem como a possível aceleração desta neoformação com o emprego de Propionato de Testosterona tópico, sendo necessário que a base cortical por onde se inicia esta cicatrização pudesse ser identificada. Além disso, nos defeitos monocorticais, pode-se assegurar a avaliação da formação óssea/neoformação no defeito a partir de suas bordas ou paredes corticais, o que foi de grande valia na avaliação histológica, onde em vários grupos se observou formação óssea na cavidade, porém esta estava relacionada ao Gelfoan e não às paredes da cavidade, não sendo então considerada como neoformação/cicatrização do defeito.

Diversos materiais têm sido utilizados na área odontológica em busca da reparação e neoformação óssea, seja ela por osteocondução ou osteoindução. Entre eles, cita-se: colágeno, hidroxiapatita, BMPs, enxerto autólogo e heterólogo, osso liofilizado, membranas, substitutos sintéticos de osso, gel de plaquetas e proteínas do esmalte (KATCHBURIAN, CERRI, 2002).

Não se encontrou na literatura nenhum trabalho avaliando a ação tópica da Testosterona na reparação e neoformação óssea.

Uma vez não havendo trabalhos neste sentido, para a proposição da dose e veículo da Testosterona, nos baseamos em artigos relativos a sua aplicação tópica em pele ou sistêmica.

Segundo RUBINSTEIN e SOLOMON *apud* SHKLAR et al. (1967), pequenas doses de Propionato de Testosterona (5µg diárias) estimulam o crescimento, tanto em ratos machos castrados ou normais, e grandes doses diárias deprimem o crescimento dos ratos.

SHKLAR et al. (1967), em seu trabalho avaliando os efeitos da Testosterona no periodonto, bem como sua ação anabólica no osso alveolar e tecido conectivo em ratos machos normais e hipofisectomizados encontraram que no grupo normal que recebeu injeções diárias de 0.25 mg de Testosterona em 0.1 ml de óleo de gergelim: o osso alveolar do septo interdental apresentou um padrão regular de atividade osteoblástica ao longo da margem distal e atividade osteoclástica ao longo da margem mesial. A impressão geral foi de aumento da atividade osteoblástica ao longo da superfície distal e até a crista alveolar, além de aumento do osteóide nestas áreas. Conforme os autores, a Testosterona aumenta significativamente a atividade do tecido conectivo normal e a atividade osteogênica do periodonto. Entretanto, em animais hipofisectomizados, onde a atividade anabólica do osso e do tecido conectivo é marcadamente reduzida, a adição de Testosterona resulta em osteogênese ativa e é responsável pela restauração do padrão fibrilar e celular do tecido conectivo periodontal.

VANDENPUT et al. (2004), em seu trabalho avaliando o papel do receptor de andrógenos na homeostase do esqueleto em camundongos machos andrógeno-resistentes usaram doses subcutâneas de Testosterona em “pellets” de 167 µg/dia e encontraram que a ação do andrógeno mediado pelo receptor AR é necessária para a formação óssea periostal e para preservação da massa óssea trabecular. A estimulação da formação óssea na superfície periostal e aumento do volume ósseo em camundongos machos depende de um receptor de andrógenos (AR) funcional.

A partir destes dados, considerando-se o tamanho dos animais, bem como a necessidade de liberação gradual do hormônio, optou-se por Propionato de Testosterona que tem como veículo óleo mineral na dose de $\cong 0.1$ ng.

SEIDLOVÁ-WUTTKE et al. (2006), em seu trabalho, avaliando a ação do estradiol, Testosterona e um extrato vegetal (*Cimicifuga racemosa* = CR) na densidade óssea e tecidos

gordurosos de ratos machos castrados, sendo estas substâncias administradas na alimentação dos animais, encontraram que a ação do E_2 e T nestes dois tecidos é diferente e que somente E_2 e não T aumenta a estabilidade óssea e diminui a acumulação de gordura. A Testosterona teria um efeito anti-osteoporótico, entretanto este efeito não se reflete na estabilidade da metáfise das tíbias analisadas. E_2 e CR tiveram efeitos lipolíticos e preveniram a acumulação de gordura em ratos castrados, um efeito não encontrado no tratamento com Testosterona. O extrato CR tem leve efeito anti-osteoporótico e lipolítico ou anti-lipotrófico, sendo que o mesmo pode vir a ser usado para prevenção de osteoporose em homens. Os dados encontrados demonstraram que E_2 é o mais eficiente hormônio para prevenção de osteoporose induzida por castração. Esta eficiência excede em alto grau a eficiência da Testosterona apesar deste hormônio também ser capaz de prevenir osteoporose em grande grau. Similarmente, o extrato CR mostra prevenir osteoporose ainda que em grau menor que E_2 , mas em similar grau da Testosterona.

Para condução das substâncias a serem analisadas nas cavidades, uma vez que se colocadas diretamente na cavidade se diluiriam no sangue, deixando de ter ação tópica gradual e podendo vir a ter ação sistêmica, bem como desejando a sua liberação gradual, optou-se pela esponja de colágeno Gelfoan.

Conforme DORNELLES et al. (2003), Ethicon[®], Gelfoan[®] e Lyostyp[®] são compostos de colágeno, utilizados como esponjas degradáveis que depois de umedecidos, têm uma apresentação gelatinosa, sendo utilizados como suporte-base para enxertos nas cirurgias otológicas, em cubos, empregados como um legítimo colchão de apoio ao enxerto, ou em pequenas tiras ou “trilhos”.

Alguns cuidados devem ser observados na aplicação da esponja de colágeno, tais como: 1-EC não deve ser aplicado na presença de infecções. 2- Por absorver fluido, Gelfoan pode se expandir em tamanho e comprimir estruturas vizinhas. Portanto, quando colocado em cavidades ou espaços tissulares fechados, recomenda-se uma compressão mínima preliminar do produto, além de cuidados para evitar a expansão excessiva. Dentre as reações adversas do

Gelfoan são relatadas infecções e reações de corpo estranho, encapsulação de fluido e formação de hematoma (DORNELLES et al., 2003).

No experimento utilizamos fragmentos de Gelfoan compatíveis com o tamanho dos defeitos, para evitar expansão e compressão de estruturas vizinhas, ou para fora da cavidade.

Outro fator que contribuiu para escolha da esponja de colágeno para condução das substâncias avaliadas, foi a sua capacidade de reabsorção, fator desejável, pois, após a liberação das substâncias, era importante que ele se degradasse e não permanecesse na cavidade, possivelmente atrapalhando a cicatrização.

Conforme STRYER *apud* DORNELLES et al. (2003), o colágeno é a proteína mais abundante do reino animal, sendo o principal constituinte dos ossos, peles e tecidos conectivos de todos os mamíferos.

A degradação do colágeno, na matriz extracelular, é obtida por uma família de colagenases que clivam suas fibras intactas em fragmentos menores que podem ser fagocitados e, subsequentemente, degradados por enzimas lisossômicas até seus aminoácidos constituintes (DORNELLES et al., 2003).

Em virtude destas constatações, e pela necessidade de aplicação da esponja em uma cavidade aberta (pois não apresentaria recobrimento ósseo, apenas recobrimento por periósteo e pele), optou-se pelo Gelfoan que, dos três materiais analisados por DORNELLES et al. (2003) em seu estudo, foi o que teve um perfil intermediário quanto à dissolução, pois a mesma era desejada porém não tão rapidamente, para que cumprisse sua função de liberação gradual das substâncias empregadas.

Por outro lado, são citadas na literatura várias desvantagens da gelatina ou esponja de colágeno como biomaterial, entre elas, o seu alto grau de degradação devido à digestão enzimática. Uma inadequada estabilidade mecânica de “scaffolds” (andaimes) derivados de proteínas pode conduzir a diferença entre formação de novo osso e grau de degradação de “scaffolds”. Um apropriado grau entre ambos é essencial para promover um ambiente para crescimento ósseo em áreas defeituosas (ROHANIZADEH et al., 2008). Isto pode ser observado em nosso experimento, onde, em vários casos, o Gelfoan retardou a cicatrização óssea, havendo formação de osso ao redor do Gelfoan juntamente com tecido conjuntivo, denotando uma reação ao Gelfoan. Esta reação pode estar ligada ao fato da esponja de colágeno funcionar como ponte para formação óssea, ou também estar relacionada à reação retardada para dissolução da esponja, uma vez que este osso não estava relacionado às paredes das cavidades, critério importante para determinação de cicatrização de defeitos monocorticais, conforme descrito por SCHLEGEL et al. (2006), citado anteriormente.

Uma possível explicação para isso pode ser encontrada no trabalho de ROHANIZADEH et al. (2008), que analisaram a proliferação, diferenciação e integração de osteoblastos em esponjas de gelatina, modificadas ou não. Três “scaffolds” foram estudados: Gelfoan (esponja de gelatina), esponja de gelatina/compósito mineral (hidroxiapatita) e esponja de gelatina /compósito polímero (PLGA (poly-lactide-co-glycolide)). A penetração celular nas esponjas foi determinada usando coloração de hematoxilina-eosina. Encontraram que tanto esponjas de gelatinas modificadas ou não modificadas demonstraram habilidade para suportar crescimento celular e sua penetração nos poros da esponja. Em comparação entre os diferentes “scaffolds”, número de células e replicação, estes foram superiores na esponja/compósito hidroxiapatita e baixos na esponja/compósito PLGA, porém não foram significantes quando comparados com a proliferação celular nas esponjas não modificadas.

Conforme concluíram ROHANIZADEH et al. (2008), Gelfoan (esponja não modificada) tem um bom potencial para suportar crescimento celular, explicando a formação de osso ao seu redor quando colocado nos defeitos ósseos dos ratos de nosso experimento.

Sobre a realização de castração nos animais, optamos por ratos machos castrados, comparados com não castrados, pois na literatura há a comprovação de que animais castrados apresentam metabolismo ósseo retardado, com possibilidade de osteopenia e/ou osteoporose (SHAHTAHERI, 2007; BROULÍK, BROULÍKOVA, 2007). Nossa intenção foi justamente avaliar a ação da Testosterona nestes animais, pois na maioria dos casos, submetidos a cirurgias para reconstruções ósseas e reabilitações com implantes dentários, os pacientes estão justamente na menopausa ou andropausa, com perdas ósseas acentuadas e metabolismo ósseo deficiente.

BROULÍK e BROULÍKOVÁ (2007) comprovaram em seu estudo que ratos castrados apresentam densidade óssea significativamente reduzida, além de baixas concentrações de Testosterona e reduzido peso da vesícula seminal. A orquidectomia em ratos machos maduros resulta no desenvolvimento rápido de osteopenia no fêmur.

Conforme KRZYMÁNSKI e WIKTOR-JEDRZEJCZAK (1996), o osso medular em adição a “stem” hematopoiético e células progenitoras, contém células fibroblastóides estromais, as quais possuem grande potencial osteogênico. Estas células que estão raramente abandonadas na medula normal, podem ser expandidas por cultura *in vitro*.

Estes achados de KRZYMÁNSKI e WIKTOR-JEDRZEJCZAK (1996) confirmam o fato de que osso cortical/neoformação óssea não é encontrado usualmente na região da medula óssea, embora lá existam células com grande potencial osteogênico. Em nosso trabalho, em muitas lâminas foi observada a presença de osso cortical neoformado na região medular. Muitos destes casos apresentavam osso que estava ao redor do Gelfoan, sendo que este último também podia ser visto na medula. Em outros, o Gelfoan estava entre as corticais do defeito criado ou ausente e, havia osso cortical neoformado na região medular das tíbias. Duas possíveis explicações para estes achados seriam: 1- quando ao redor do Gelfoan, este estaria funcionando como um “scaffold” para proliferação de células ósseas nesta região e, 2- quando sem a presença do Gelfoan, este osso neoformado na região medular poderia estar relacionado inicialmente a esponja de colágeno que lá teria

sido introduzida e que já teria sido reabsorvida, restando apenas o osso neoformado na medula.

Outro achado interessante nos resultados histológicos foi a presença de osso ao redor da esponja de colágeno, sem relação com as paredes corticais do defeito criado, osso este que não foi considerado como cicatrização da cavidade. Este osso seria uma reação ao Gelfoan, uma vez que em muitos casos também estava associado a tecido conjuntivo. É interessante notar que este osso acompanhava a localização da esponja de colágeno, ou seja, estava localizado ao redor do Gelfoan tanto quando este estava na medular, entre as corticais ou sobre a cavidade. Este osso, mesmo quando entre as corticais, não tinha ligação com as paredes, ou seja, não significando cicatrização do defeito criado. Na verdade, este osso não estava preenchendo a cavidade, objeto de nosso estudo.

Além disso, nos casos onde macroscopicamente se observou formação de calo ósseo, ou seja, osso acima da cavidade, normalmente na avaliação histológica, este osso estava circundando o Gelfoan que se localizava sobre a cavidade (casos dos animais sacrificados aos 30 dias, onde foi reaplicado o Gelfoan sobre a cavidade e não introduzido na cavidade, para não interferir negativamente (retardando) o processo de cicatrização). Conclui-se daí que este osso que aparentemente denotaria uma exacerbada formação óssea na cavidade, na verdade, não o era, pois era osso reacional ao Gelfoan e nem sempre havia formação óssea à partir das corticais do defeito criado.

Com relação aos resultados das análises histológicas descritiva/comparativa e descritiva semi-quantitativa, pode-se dizer que comparando os animais castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e as diferentes formas de tratamento a que foram submetidos, os dados das duas análises coincidem no fato de que a neoformação óssea foi maior e melhor no grupo da Perfuração comparado com os demais grupos, onde G+PT e apenas G apresentaram cicatrização semelhante, com formação de osso imaturo. Já G+OM teve o pior resultado, com ausência de formação óssea na cavidade. É importante ressaltar que no grupo do Propionato de Testosterona foi observada neoformação óssea entre as corticais e também ao redor do

Gelfoan, independente da localização deste. O osso formado ao redor do Gelfoan não tinha nenhuma relação com a cicatrização das cavidades.

Já na avaliação macroscópica deste mesmo grupo, observa-se no grupo experimental preenchimento total da cavidade por osso nos animais que receberam G+PT, e no grupo que recebeu G+OM há a formação de uma grande fibrose, que não só recobre o defeito em si, mas também o tecido ósseo circunvizinho. Removida esta grande fibrose, observa-se preenchimento por tecido mole da cavidade. É importante salientar aqui que verifica-se macroscopicamente a completa ossificação e desaparecimento dos limites da cavidade nas patas tratadas com Gelfoan mais Propionato de Testosterona (onde este tecido ósseo formado é semelhante ao tecido ósseo adjacente).

A partir destes dados podemos afirmar que os ratos castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios e tratados com PT+G tiveram juntamente com os tratados com G isolado, uma melhor cicatrização do que aqueles tratados com Óleo Mineral, que não cicatrizaram. Comparando-se este grupo de animais castrados com o grupo de não castrados sacrificados também aos 15 dias pós-operatórios, observa-se que o grupo tratado com G+PT castrado teve cicatrização óssea e o grupo tratado com G+PT não castrado, não cicatrizou. Levando-se em consideração o fato de que os animais castrados teriam uma cicatrização retardada em função de apresentarem níveis baixos ou ausentes de Testosterona circulante, pode-se dizer que o Propionato de Testosterona tópico neste grupo, contribuiu para a neoformação óssea.

Mais interessantes são os dados dos animais sacrificados aos 30 dias pós-operatórios, onde na descrição comparativa observando-se o grupo dos animais castrados e o dos não castrados, o resultado geral em termos de cicatrização óssea foi melhor no grupo dos castrados, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos instituídos dentro de cada grupo (Propionato de Testosterona ou Óleo Mineral). Já na avaliação descritiva/semi-quantitativa, observa-se um melhor resultado também no grupo dos castrados, porém o

Propionato de Testosterona teve maior cicatrização que o Óleo Mineral, onde com a aplicação de Propionato de Testosterona observa-se formação de osso lamelar e, no grupo do Óleo Mineral, osso imaturo preenchendo o defeito. No grupo dos não castrados as duas formas de tratamento tiveram resultados similares, com formação de osso imaturo. Aqui mais uma vez, em se tratando de animais castrados, o grupo tratado com G+PT teve a maior cicatrização, concluindo-se que PT contribuiu para um melhor resultado quanto à neoformação óssea neste grupo. Observa-se também que a presença de inflamação é contrária a neoformação óssea, ou seja, nos animais que apresentavam inflamação, a neoformação óssea estava reduzida, e naqueles com ausência de inflamação havia formação de osso maduro. Os demais parâmetros observados apresentaram-se semelhantes entre as duas formas de tratamento e entre animais castrados e não castrados.

Nos animais castrados tratados com G+PT ou G+OM sacrificados aos 30 dias pós-operatórios observa-se formação óssea entre as paredes corticais do defeito, denotando cicatrização óssea da cavidade, porém o Gelfoan é encontrado sobre a cavidade com grande reação ao seu redor, tanto com formação de tecido conjuntivo quanto de osso. Estes achados estão relacionados à presença de calo ósseo que não necessariamente representa exacerbada cicatrização do defeito, como descrito anteriormente.

6. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos podemos dizer que com relação à formação de osso entre as corticais (cicatrização do defeito ósseo criado), observa-se que no grupo dos animais castrados sacrificados aos 15 dias pós-operatórios, tanto G isolado como G+PT tiveram resultados semelhantes com formação de osso imaturo, porém G+OM não teve cicatrização óssea. Já no grupo dos não castrados também sacrificados aos 15 dias, há formação de osso imaturo nos grupos P e G, e não houve formação óssea nos grupos tratados com G+OM e G+PT. Tanto nos ratos castrados ou não castrados, sacrificados aos 30 dias, todos os animais tiveram cicatrização óssea, porém os não castrados tinham menor quantidade de osso formado, tanto no tratamento com Propionato de Testosterona quanto Óleo Mineral. Já dentre os castrados a maior formação óssea foi nos animais que receberam Propionato de Testosterona. A partir destes achados, sabendo-se que os animais castrados apresentam níveis reduzidos ou ausentes de Testosterona circulante, e conseqüentemente, cicatrização óssea retardada, pode-se concluir que o Propionato de Testosterona tópico contribuiu para a regeneração óssea nestes dois grupos experimentais.

Já o Gelfoan atrapalhou a cicatrização da cavidade quando localizado entre as corticais. Uma possibilidade a ser observada é a de aplicar a Testosterona com esponja de colágeno, ao invés de dentro da cavidade, sobre ela.

G+PT podem formar mais osso que G+OM, porque o Óleo causa reação inflamatória, com mais formação de tecido conjuntivo. Uma alternativa seria aplicar a Testosterona sem o Gelfoan, e utilizando um veículo não oleoso para a Testosterona.

Nem todo osso entre as corticais denota cicatrização óssea do defeito. Existe o osso da reação ao Gelfoan[®] que pode estar localizado entre as corticais, sobre a cavidade ou na região medular, isto deve ser levado em consideração, pois a cicatrização da cavidade provém de osso formado das paredes da cavidade para o centro.

Alguns fatores podem ter prejudicado a análise de resultados e devem ser levados em consideração em experimentos futuros como: a diminuição do número de variáveis a serem avaliadas, a aplicação direta da Testosterona ou através de um material inerte, que não provoque reação nos tecidos, além do emprego de veículo para Testosterona não oleoso e o mais inerte possível.

Na literatura dentro da engenharia tecidual são citados vários materiais como condutores para a aplicação de “BMPs” nos tecidos. Estes materiais podem vir a ser utilizados para introdução da Testosterona nas cavidades, citando-se entre eles: as cápsulas de lisina tricalcio fosfato calcinado (WINGERTER et al.,2007) e os implantes combinando a substância a ser aplicada com partículas de poly[D,L-(lactide-co-glycolide)] (KIRKER – HEAD et al ., 1998).

Com base nos resultados encontrados, concluiu-se que: 1º) em dois grupos experimentais o PT teve melhores resultados, mas os dados obtidos não permitem uma conclusão definitiva; 2º) a Testosterona empregada de forma tópica mostrou-se promissora quanto a ativação da regeneração óssea; 3º) o Propionato de Testosterona não parece ser a forma farmacêutica mais apropriada, devido a sua forma de liberação muito lenta do hormônio e conseqüente pouca eficiência, devendo-se utilizar como alternativas para aplicação da Testosterona, a mesma diluída em outro veículo e introduzida nos defeitos através de substâncias inertes, que não causem reação tecidual ou inflamatória. Estes

resultados obtidos merecem ser aprofundados e aperfeiçoados, utilizando curvas dose-resposta, outros preparados de Testosterona e tempos distintos.

A partir destas constatações pretendemos dar continuidade aos estudos, pois a Testosterona empregada de forma tópica apresentou bons resultados quanto à regeneração óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEATO, M.; KLUG, J. Steroid hormone receptors: an update. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v. 6, p. 225-236. 2000.

BROULÍK, P.D.; BROLULÍKOVÁ, K. Raloxifen prevents bone loss in castrated male mice. **Physiol. Res**, v.56, p. 443-447. 2007.

CHAVES, M.G.A.M., BRANDÃO, A.A.H. et al. Efeitos do medicamento homeopático *Symphytum officinallis* e do enxerto de osso bovino na regeneração óssea: estudo histomorfométrico. **Rev. Bras. Impl Prot Impl.**, Curitiba, v.11, n.44, p.324-336, out.-dez. 2004.

COOK, S.D.; RUEGER, D.C. Osteogenic protein-1: biology and applications. **Clin.Orthop.Relat Resar**, n.324, p.29-38, março,1996.

DORNELLES, C., DA COSTA, S.S. et al. Estudo comparativo da dissolução de três diferentes marcas de colágeno utilizadas em técnicas cirúrgicas otológicas. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, Porto Alegre, v. 69, n. 6, p.744-751, nov.-dez. 2003.

FARRIS, E.J.; GRIFFITH J.Q. **The rat in laboratory investigation**. New York: Hafner Press, 1949. 542p.

FREITAS LEONEL, E.C.; ANDRADE SOBRINHO, J.; OLIVEIRA RAMALHO, L.T. et. aL. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cir. Bras.** [serial online] v.19, n.4, Jul-Ag. 2004 Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb> .

FUJITA, T.; OHTANI, J. et al. Effects of sex hormone disturbances on craniofacial growth in newborn mice. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.83, n.3, p. 250-254. 2004.

FUJITA, T.; OHTANI, J. et al. Influence of sex hormone disturbances on the internal structure of the mandible in newborn mice. **Eur. J. Orthod.**, Oxford, v.28, n. , p. 190-194. 2006.

GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 19ª. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2000. 623p. Cap.23: As gônadas: desenvolvimento e função do sistema reprodutor, p. 299-328.

GRANDI, G. Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de α -TCP e os grânulos de β -TCP/HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos. **Dissertação Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2007.

HAKOLA, K.; PIERROZ, D. D. et al. Dose and time relationships of intravenously injected rat recombinant luteinizing hormone and testicular testosterone secretion in the male rat. **Biol. Reprod.**, New York, v. 59, p. 338-343. 1998.

KASPERK, C.H.; WERGEDAL, J.E. et al. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. **Endocrinology**, Springfield, v.124, n.3, p. 1576-1578. 1989.

KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea *in* **Periodontia, Cirurgia, Cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. 516p. Cap.24, p.443-472.

KIRKER-HEAD, C.A.; GERHART, T.N.; ARMSTRONG, R. et al. Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, Lippincott, n. 349, p. 205-217. 1998.

KRZYMÁNSKI, G.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. Autologous bone marrow-derived stromal fibroblastoid cells grown in vitro for the treatment of defects of mandibular bones. **Transplantation Proceedings.**, v. 28, n.6, p. 3528-3530, dec. 1996.

KUMAR, M.; TINDAL, D. J. Transcriptional regulation of the steroid receptor genes. **Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.**, New York, v. 59, p. 289-306. 1998.

LIEBERHERR, M.; GROSSE, B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive g-protein. **J. Biol. Chemistr**, Baltimore, v.269, n. 10, p. 7217-7223, mar. 1994.

LIKE, X.; MONROE, E.A. Calcium Phosphate Dental Cements. **Mat Res Soc SympProc**, v.179, p.25-39, 1991.

McEWEN, B. S.; KREYS, L. C. et al. **The Hypothalamus**. New York: Raven Press, p. 255-268. 1978

MEINEL, L.; FAJARDO, R.; HOFMANN, S. et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. **Bone**, v.37, p.688-698, sep. 2005.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and Sterility**, New York, v.77, n.4, suppl.4, p. S34-41, apr. 2002.

PEREIRA, S.L.S. Efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos: estudo radiográfico e histológico em coelhos. **Dissertação Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, 1997.

PERRI DE CARVALHO, P.S.; LUPPINO, F.; MENDES, V.C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia *in* **Terapia Clínica Avançada em Implantodontia**. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002. 329p. Cap.2, p. 18-30.

PETTWAY, G. J.; SCHNEIDER, A.; KOH, A.J. et al. Anabolic actions of PTH (1-34): Use of a novel tissue engineering model to investigate temporal on bone. **Bone**, v.36, p. 959-970. 2005.

ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M.S.; MASON, R.S. Gelatin sponges (Gelfoan[®]) as a scaffold for osteoblasts. **J. Mater. Sci: Mater. Med.**, v. 19, p. 1173-1182. 2008.

ROSSI, A.; CALO, E. Effect of 4-hydroxy-19-nortestosterone-17-cyclopentylpropionate on periodontal, dental and oral tissues. (Histological study on albino rats). **Riv. Ital. Stomatol.**, Viterbo, v.21, n.12, p. 1255-1266, dec. 1966.

SANTOS, L.A. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica. **Tese Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SCHLEGEL, K.A.; LANG, F.J.; DONATH, K. et al. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. **Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.102, p. 7-13. 2006.

SEIDLOVÁ-WUTTKE, D.; STÜRMER, K.M. et al. Contrasting effects of estradiol, testosterone and of a black cohosh extract on density, mechanical properties and expression of several genes in the metaphysis of the tibia and on fat tissue of orchidectomized rats. **Maturitas The European Menopause Journal**, Amsterdam, v. 55, suppl. 1, p. S64-74, nov. 2006.

SELYE, H. Anaesthetic effects of steroid hormones. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, Malden, v. 46, p. 116-121. 1941.

SHAHTAHERI, S.M. The microanatomy of trabecular bone in young normal and osteoporotic elderly males. **The official journal of the International Society for the Study of the Aging Male**, v. 10, n. 2, p.71-75, Jun. 2007.

SHIRATORI, K.; MATSUZAKA, K.; KOIKE, Y. et al. Bone formation in β -tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein m RNA. **Biomedical Research**, v.26, n.2, p.51-59, 2005.

SHKLAR, G.; CHAUNCEY, H. H.; SHAPIRO, S. The effect of testosterone on the periodontium of normal and hypophysectomized rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v.38, n.3, p. 203-210, may-jun. 1967.

VANDENPUT, L.; SWINNEN, J. V. et al. Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.19, n.9, p. 1462-1470, may 2004.

WINGERTER, S.; TUCCI, M. et al. Evaluation of short-term healing following sustained delivery of osteoconductive agents in a rat femur drill defect model. **Biomed. Scienc. Instrum.**, v.43, p.188-193. 2007.

WONG, G.; COHN, D.V. Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. **Nature**, v.252, p. 713-715, dec. 1974.

WOZNEY, J.M.W. Biology and clinical applications of rhBMP-2 in **Tissue Engineering**. China: Quintessence, 1999. 297p. Cap. 6, p.103-124.

ZANELLO, L.P.; NORMANN, A.W. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ - vitamin D_3 requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. **PNAS**, v.101, n.6, p. 1589-1594, feb. 2004.

APÊNDICE A
**FICHA DE COLETA DE DADOS – ANÁLISE DESCRITIVA SEMI-
QUANTITATIVA**

Lâmina nº.....			
Características Analisadas/Grau em que aparecem	+	++	+++
Inflamação			
Cápsula Fibrosa			
Neoformação óssea na cavidade			
Neoformação óssea na medular			