

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Campus de Jaboticabal

USO DO DECANOATO DE NANDROLONA NO
TRATAMENTO DA NÃO UNIÃO ÓSSEA EM FRATURAS DO
RÁDIO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS
(Oryctolagus cuniculus)

Adrielly Dissenha
Médica Veterinária

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Campus de Jaboticabal

USO DO DECANOATO DE NANDROLONA NO
TRATAMENTO DA NÃO UNIÃO ÓSSEA EM FRATURAS DO
RÁDIO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS
(Oryctolagus cuniculus)

Adrielly Dissenha

Orientador: Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

2019

D613u

Dissenha, Adrielly

Uso do decanoato de nandrolona no tratamento da não união óssea em fraturas do rádio - estudo experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Adrielly Dissenha. -- Jaboticabal, 2019

51 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Bruno Watanabe Minto

1. Cirurgia veterinária. 2. Fraturas ósseas. 3. Regeneração óssea.
4. Calo ósseo. 5. Esteróide. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DO DECANOATO DE NANDROLONA NO TRATAMENTO DA NÃO UNIÃO ÓSSEA EM FRATURAS DO RÁDIO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

AUTORA: ADRIELLY DISSENHA

ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. NATALIE BERTELIS MERLINI
Departamento de Medicina Veterinária-UEM / Umuarama/PR


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Adrielly Dissenha, nascida em 17 de janeiro de 1993, no município de Campo Mourão, estado do Paraná, filha de Altamiro Dissenha e Marlene Siqueira Queiróz. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Maringá (UEM), campus de Umuarama, em fevereiro de 2011. Nesta instituição, participou do projeto de extensão “Projeto Populacional de Cães e Gatos” na categoria de bolsista, em 2013. Também atuou como monitora da disciplina de técnica operatória no ano de 2014. Foi um dos membros fundadores do Grupo de Estudos em Pequenos Animais (GEPA) durante o ano de 2017. Realizou o programa de Residência em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais nesta mesma instituição, entre 2016 e 2018. Ingressou no programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária como mestranda na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal, em março de 2018 – atualmente.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

Dedico este trabalho aos meus amados pais Marla e Altamiro
aos meus irmãos Veridiana e João Paulo
e a todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter-me permitido viver com saúde e discernimento, me dando força e iluminando meus caminhos.

Aos meus pais e meus irmãos, que sempre estiveram na retaguarda, me apoiando e não me deixando desanimar.

Ao meu orientador, Prof. Bruno Watanabe Minto, por todo ensinamento, paciência e dedicação nesta jornada.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e todos seus funcionários, que me abriram as portas e tornaram esse estudo possível.

Ao programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária e a todos os meus colegas do Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária (LONV), especialmente aos que me ajudaram na execução desta pesquisa – Karina, Julián, Felipe, Pedro, Dayvid e Lívia.

À residente do serviço de diagnóstico por imagem, Marina, e ao técnico Eduardo pelo auxílio na realização dos exames radiográficos.

Aos professores Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, Lizandra Amoroso e Silvana Martinez Baraldi Artoni, pela participação e colaboração neste trabalho.

Ao departamento de Morfologia e Fisiologia Animal desta universidade, pela disponibilidade dos equipamentos para realização dos exames histológicos e densitométricos.

Às pós-graduandas Lismara, Aline e Fabiana pelo apoio na realização dos exames e das cirurgias.

Aos meus amigos da República Misto Quente, pela recepção e convívio diário. Ao professor Alan Rodrigo Panosso, do Departamento de Ciências Exatas desta universidade, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À CNPq pela bolsa de mestrado, sem a qual seria impossível a realização desse experimento.

Ao setor de Cunicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias que nos cedeu o local para mantimento dos animais utilizados no presente estudo.

Ao professor Carlos Augusto Araújo Valadão pela disponibilização do laboratório onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos.

Aos animais que participaram deste projeto, que sempre estarão na minha memória como os grandes protagonistas deste estudo.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação faz parte das obrigações para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – campus de Jaboticabal – SP. Este trabalho foi apresentado no formato de capítulos para melhor compreensão e apresentação dos resultados, no qual o capítulo 1 (um) representa as considerações gerais, englobando a introdução, revisão de literatura, objetivos, hipóteses e o resumo da metodologia, bem como os resultados; o capítulo 2 (dois), por sua vez, será o artigo científico; e o capítulo 3 (três) corresponderá às considerações finais.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Regeneração óssea.....	2
2.2 União retardada e não união óssea.....	3
2.3 Decanoato de nandrolona	6
3. HIPÓTESES	7
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 Objetivos gerais	8
4.2 Objetivos específicos.....	8
5. MATERIAL E MÉTODOS	8
5.1 Instalações	9
5.2 Animais.....	9
5.3 Grupos experimentais.....	9
5.4. Procedimento cirúrgico	10
5.4.1 Pré-operatório	10
5.4.2 Anestesia	11
5.4.3 Cirurgia.....	11

5.4.4	Pós-operatório.....	13	
5.5.	Avaliação pré e pós-tratamento.....	14	
5.5.1	Avaliação radiográfica	14	
5.5.2	Avaliação densitométrica e histológica.....	15	
6.	Análise estatística.....	17	
	REFERÊNCIAS	17	
CAPÍTULO 2 – Artigo científico nas normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....			20
INTRODUÇÃO			22
MATERIAL E MÉTODOS.....			23
RESULTADOS.....			29
DISCUSSÃO			42
CONCLUSÃO.....			46
REFERÊNCIAS.....			47
ANEXO 1.....			48

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Uso do decanoato de nandrolona no tratamento de não união óssea em fraturas do rádio. Estudo experimental em coelhos**", protocolo nº 019155/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	05/03/2018 a 05/03/2020
Espécie / Linhagem	<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Leporina - Nova Zelândia
Nº de animais	48
Peso / Idade	4 Kg / 170 dias
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Biotério da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.


Prof. Dr. Everton Cid Rigobelo
 Vice Coordenador – CEUA

**USO DO DECANOATO DE NANDROLONA NO TRATAMENTO DA NÃO UNIÃO
ÓSSEA EM FRATURAS DO RÁDIO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

RESUMO – O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia do Decanoato de Nandrolona (DN) em fraturas do rádio após indução da não união óssea por defeito segmentar. Foram utilizados 47 coelhos, da raça Nova Zelândia Branco, com peso médio de 3,8 kg, divididos aleatoriamente em grupos de 8 animais. Os grupos Controle Machos (GCM) e Controle Fêmeas (GCF) foram submetidos à eutanásia aos 45 dias, os grupos Nandrolona Machos (GNM) e Nandrolona Fêmeas (GNF) tratados com aplicações semanais de DN na dose de 10mg/kg, via intramuscular (IM) durante 4 semanas. Os Grupos Placebo Machos (GPM) e Grupo Placebo Fêmeas (GPF), tratados com aplicações semanais de NaCl 0,9% (IM), durante o mesmo período. Foi realizado exame radiográfico após a cirurgia e aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. Os animais dos grupos GNM, GNF, GPM e GPF foram submetidos à eutanásia aos 90 dias. Realizou-se exame de densitometria óssea do rádio dissecado após a eutanásia em todos os grupos, bem como análise histológica. Para as variáveis não-paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para as variáveis paramétricas foi utilizado o teste Shapiro-Wilk, ambos a 5% de significância. Radiograficamente, os grupos tratados com DN apresentaram média de escore superior aos demais grupos na formação de calo ósseo. Na análise densitométrica, também foi observada uma melhora significativa ao parâmetro de composição mineral óssea (BMC) nos grupos GNM e GNF. Os machos apresentaram maiores médias para os parâmetros conteúdo mineral ósseo local (BMCL) e densidade mineral óssea local (BDML). Não houve diferença estatística significativa na avaliação histológica.

Palavras-chave: anabolizante, complicação, cicatrização, dxa, microscopia.

**USE OF NANDROLONE DECANOATE IN THE TREATMENT OF BONE NON-
UNION IN RADIOUS FRACTURES - EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

ABSTRACT - The aim of research was to evaluate Nandrolone Decanoate (DN) efficacy in radius fractures after induction of bone nonunion by segmental defect. Forty-seven New Zealand White rabbits weighing 3.8 kg were randomly divided into groups of 8 animals. Male Control Group (GCM) and Female Control Group (GCF) were euthanized at 45 days. Nandrolone Male Group (GNM) and Nandrolone Female Group (GNF) treated with weekly doses of DN (10mg/kg) intramuscular (IM) for 4 weeks. Placebo Males Groups (GPM) and Placebo Females Group (GPF) treated with weekly applications of 0.9% NaCl (IM) during the same period. A radiographic examination was performed after surgery and at 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days. The groups GNM, GNF, GPM and GPF were euthanized at 90 days. Bone densitometry of dissected radius after euthanasia was performed in all groups as well as histological analysis. For nonparametric variables was used Kruskal-Wallis test. For parametric variables used Shapiro-Wilk test, both at 5% significance level. Radiographically groups were treated with DN presented higher average score than other groups in bone callus formation. In densitometric analysis a significant improvement in bone mineral composition (BMC) was also observed in GNM and GNF groups. Males showed higher media for local bone mineral content (BMCL) and local bone mineral density (BDML). There was no statistically significant difference in histological evaluation.

Key words: anabolic, complication, healing, dxa, microscopy.

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Página

Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro reação periosteal. (Adaptado de An *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008). 14

Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro volume do calo ósseo. (Adaptado de AN *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008). 15

Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea. (Adaptado de An *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008). 15

CAPÍTULO 2

Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro reação periosteal. (Adaptado de An *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008)27

Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro volume do calo ósseo. (Adaptado de AN *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008)27

Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea. (Adaptado de An *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008)28

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Página

Figura 1. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). A: Incisão de pele. B: Mensuração de 10mm com espécimetro. C: Secção do osso realizada com serra oscilatória. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da FCAV. 12

Figura 2. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) A: ostectomia parcial do rádio realizada com serra oscilatória. B: Osso após a retirada do fragmento do rádio. C: Sutura realizada. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da Unesp/FCAV. 13

CAPÍTULO 2

Figura 1. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). A: Incisão de pele. B: Mensuração de 10mm com espécimetro. C: Secção do osso realizada com serra oscilatória. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da Unesp/FCAV. 25

Figura 2. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) A: ostectomia parcial do rádio realizada com serra oscilatória. B: Osso após a retirada do fragmento do rádio. C: Sutura realizada. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da Unesp/FCAV. 26

Figura 3. Média e o erro padrão do escore de avaliação radiográfica do parâmetro reação periosteal para os grupos GNM, GNF, GPM e GPF, dos 45 aos 90 dias. 30

Figura 4. Média e o erro padrão do escore de avaliação radiográfica do parâmetro volume do calo ósseo para os grupos GNM, GNF, GPM e GPF, dos 45 aos 90 dias. 31

Figura 5. Média e o erro padrão do escore de avaliação radiográfica do parâmetro reação qualidade da ponte óssea para os grupos GNM, GNF, GPM e GPF, dos 45 aos 90 dias. 31

Figura 6. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna direita do animal GNF4. A: Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). B: 45 dias de pós-operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). C: 60 dias de evolução, na segunda semana de tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar parcialmente

preenchido (seta). D: Aos 75 dias, mostrando o defeito segmentar preenchido parcialmente (seta). Defeito ósseo segmentar preenchido quase completamente aos 90 dias (seta).....32

Figura 7. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna direita do animal GNM3. A: Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). B: 45 dias de pós-operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). C: 60 dias de evolução, evidenciando o defeito ósseo segmentar parcialmente preenchido (seta). D: Aos 75 dias, mostrando o defeito segmentar preenchido quase completamente (seta). E: Defeito ósseo segmentar preenchido quase completamente aos 90 dias (seta).....33

Figura 8. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal de rádio e ulna direita do animal GPM10. A: Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). B: Aos 45 dias de pó operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). C: 60 dias de evolução, evidenciando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). D: Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com diminuição da reação periosteal (seta). E: Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio sem reação periosteal (seta).....34

Figura 9. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal de rádio e ulna direita do animal GPF7. A: Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). B: 45 dias de pós-operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com discreta reação periosteal (seta). C: Aos 60 dias de evolução, defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com discreta reação periosteal (seta). D: Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal não progressiva (seta). E: Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal não progressiva (seta).....35

Figura 10. Média e o erro padrão do conteúdo mineral ósseo – BMC, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.....36

Figura 11. Média e o erro padrão da densidade mineral óssea – BMD, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.....36

Figura 12. Média e o erro padrão do conteúdo mineral ósseo local – BMCL, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.....37

Figura 13. Média e o erro padrão da densidade mineral óssea local – BMDL, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.....37

Figura 14. Média e erro padrão de macroscopia para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	38
Figura 15. Média e erro padrão de tecido de granulação para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	39
Figura 16. Média e erro padrão de osteoblastos e fibras colágenas para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	39
Figura 17. Média e erro padrão de tecido de osso não mineralizado para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	40
Figura 18. Média e erro padrão de tecido cartilaginoso os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	40
Figura 19. Média e erro padrão de osso lamelar para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	41
Figura 20. Média e erro padrão de vasos sanguíneos para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	41
Figura 21. Média e erro padrão de canal medular para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

- µg:** micrograma
- BID:** do latim “*bis in die*” - duas vezes ao dia
- BMC:** conteúdo mineral ósseo
- BMCL:** conteúdo mineral ósseo local
- BMD:** densidade mineral óssea
- BMDL:** densidade mineral óssea local
- BMP:** proteínas morfogenéticas ósseas
- cm²:** centímetro quadrado
- CTM:** células tronco mesenquimais
- FGF:** fator de crescimento de fibroblastos
- g:** grama
- GC:** grupo controle
- GCF:** grupo controle fêmeas
- GCM:** grupo controle machos
- GN:** grupo nandrolona
- GNF:** grupo nandrolona fêmeas
- GNM:** grupo nandrolona machos
- GP:** grupo placebo
- GPF:** grupo placebo fêmeas
- GPM:** grupo placebo machos
- HE:** Hematoxilina e Eosina
- HIV:** vírus da imunodeficiência humana
- IGF:** fator de crescimento semelhante à insulina
- IM:** intramuscular
- IV:** intravenoso
- kg:** quilograma
- kV:** kilivoltagem
- mA:** miliamperagem
- mA_s:** miliamperagem por segundo
- mg/kg:** miligrama por quilo
- mg:** miligrama

NaCl: cloreto de sódio

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PRP: plasma rico em plaquetas

SC: subcutâneo

SID: do latim "*semel in die*" - uma vez ao dia

TGF- β : fator de crescimento transformante

TM: Tricômio de Masson

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O esqueleto é composto por ossos rígidos constituídos por tecido ósseo, medula óssea, endóstio, perióstio, cartilagem, nervos e canais vasculares, podendo ser dividido em 60 a 70% de porção inorgânica, 5 a 10% de água e o restante, composto por uma matriz orgânica de células, colágeno e proteínas (Collignon et al., 2017).

Uma fratura ocorre quando há perda da continuidade da superfície óssea ou cartilaginosa, completa ou incompletamente. Gera lesões aos tecidos moles adjacentes, comprometendo a vascularização do mesmo e, potencialmente, a função do membro (Piermattei et al., 2009).

As fraturas de ossos longos em pequenos animais são uma das maiores casuísticas na rotina cirúrgica de pequenos animais. Na maioria dos casos, intervenções cirúrgicas são necessárias para estabilização dessas fraturas, criando um ambiente favorável à consolidação óssea e acelerando o processo natural de cicatrização. Algumas vezes essas intervenções não são suficientes para que o organismo consiga promover a consolidação, seja por fatores extrínsecos (falha do implante, estabilização pobre ou exacerbada) ou intrínsecos (idade do paciente, sexo, afecções concomitantes, infecções, entre outros) (Marques et al., 2016).

Uma das complicações mais comuns nas osteossínteses de ossos longos, é, sem dúvida, as uniões retardadas e as não uniões ósseas. Estas complicações são identificadas quando há uma demora maior do que a esperada para que o osso se consolide (união retardada) ou quando não é oferecido ao osso o ambiente necessário para consolidação, a qual não ocorre (não-união). Estas geralmente ocorrem quando há excesso de movimentação no foco da fratura e/ou a presença de grandes falhas ósseas (Tsai 2016; Massie et al., 2017).

A não união óssea afeta, principalmente, regiões onde a vascularização e a cobertura muscular perióssea é escassa. Segundo Munakata et al. (2017), o rádio e a ulna são os ossos mais acometidos por não união óssea quando fraturados (em torno de 60% dos casos), seguido da tíbia que é afetada em 25% dos casos. A intervenção cirúrgica é por muitas vezes necessária, visando o debridamento do osso e uma estabilização mais eficaz para que este consiga se consolidar.

Um dos grandes desafios do tratamento das não uniões não viáveis é a bioativação do ambiente de fratura. Classicamente, o uso de enxertos ósseos, medula óssea e outros fatores de ativação tem sido utilizados, entretanto porcentagens alarmantes de insucesso ainda são observadas, especialmente em cães de porte pequeno; e miniatura (Dinopoulos e Giannoudis, 2007; Krauss e Bayer, 2012).

Os hormônios esteroides são de extrema importância para a saúde dos ossos. *In vitro*, as células osteoblásticas parecem ser estimuladas com o uso de andrógenos. Partindo deste ponto, muitos estudos têm sido realizados utilizando esteroides anabolizantes como um auxiliar à reparação óssea. Embora o mecanismo de ação desses fármacos não tenha sido claramente elucidado, acredita-se que estes sejam capazes de estimular a osteoblastogênese, inibindo a ação dos osteoclastos e acelerando a consolidação óssea. O decanoato de nandrolona é um esteroide utilizado para prevenção de osteopenia, aumento da massa óssea e tratamento de osteopenia em diferentes animais, porém seu uso *in vivo* requer mais estudos (Abedi et al., 2012; Marques, 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Regeneração óssea

Após a ocorrência da fratura, imediatamente é iniciado o processo biológico que visa restaurar o tecido ósseo. A cicatrização do osso ocorre de forma diferente dos tecidos, sendo o tecido ósseo o único que possui a

capacidade de regeneração completa, sem a formação de uma cicatriz propriamente dita (Knight e Hankenson, 2013; Johnson, 2014).

A consolidação da fratura é realizada por uma cascata de eventos, composta por três principais estágios: inflamação, formação de calo ósseo e remodelação (Ahmad et al., 2013). Pode ocorrer de duas maneiras, sendo elas indireta e direta. Na cicatrização óssea indireta, há formação de um calo fibrocartilaginoso, previamente à formação do tecido ósseo, seguida de uma remodelação. Este fenômeno é prevalente em ambientes de fratura mecanicamente instáveis (Perren, 2002; Johnson, 2014). Em ossos fraturados, onde há contato íntimo entre os fragmentos e estabilidade absoluta, a cicatrização é predominantemente direta (Ai Aql et al., 2008).

A cicatrização direta não tem como etapas a diferenciação e reabsorção óssea, progredindo diretamente (mas não mais rapidamente) para a remodelação Harvesiana (Perren et al., 2002).

Na presença de vascularização adequada, o tipo da reparação da fratura dependerá do ambiente mecânico. Assim, a consolidação poderá ocorrer por meio de um processo natural ou por osteossíntese (Johnson et al., 2005). Ocorre primariamente a formação de um hematoma e uma resposta inflamatória, onde as citocinas induzem esta resposta a fim de recrutar outras células inflamatórias, melhorar a síntese de matriz extracelular e estimular a angiogênese (Ai Aql et al., 2008; Tan et al., 2015).

É importante ressaltar que as formas de cicatrização óssea possuem diferentes características histológicas, podendo ocorrer de forma isolada ou combinada, a fim de alcançar a consolidação do osso e retorno à função do membro (Johnson et al., 2005).

2.2. União retardada e não união óssea

A união retardada de uma fratura ocorre quando há maior tempo na consolidação óssea que o esperado. Ou seja, é mais demorada quando comparada a fraturas parecidas, em condições e técnicas similares. Em cães, há tabelas que indicam o tempo médio para certos tipos de fraturas (Rovesti,

2005). A fratura poderá consolidar ao longo do tempo ou progredir para não união, onde não ocorre a cicatrização do osso (Schmaedecke et al., 2003). Muitos fatores, biológicos e mecânicos, são considerados de risco para ambas as complicações, tais como o estado geral do paciente, tipo de trauma, comprometimento dos tecidos moles, tipo de tratamento realizado e medicamentos utilizados no período pós-operatório. Um dos fatores mais comuns é a estabilização inadequada da fratura. Aos exames radiográficos, há persistência da linha de fratura, sem esclerose das extremidades. O calo ósseo é notável, porém reduzido e pode ainda não haver formação de ponte no foco de fratura (Piermattei et al., 2009; Tudury et al., 2017).

Dentre os fatores biológicos, o tipo de fratura é de extrema importância. Em fraturas causadas por traumas de alta energia observa-se lesão substancial aos tecidos ósseos e moles adjacentes. A lesão periosteal associada à desinserção muscular e o próprio dano aos grupamentos musculares resulta em menor suprimento vascular, diminuindo assim o potencial para cicatrização óssea (Krauss e Bayer, 2012).

De uma forma geral, as uniões retardadas podem ser revertidas, desde que se corrija as falhas mecânica, biológica ou ambas. Caso faça-se necessário, a retirada de implantes soltos ou falhos deve ser considerada, refazendo a estabilização de maneira correta. O uso de enxertos de osso esponjoso também é indicado (Rovesti, 2005).

A perpetuação dos fatores causadores ou facilitadores da união retardada representa risco potencial para a não união óssea. As não uniões podem ser viáveis ou não, dependendo da qualidade da patência vascular. As viáveis são subdivididas em hipertróficas, moderadamente hipertróficas ou oligotróficas, dependendo do tamanho do calo ósseo visualizado nos exames radiográficos (Krauss e Bayer, 2012). Há ausência de atividade de consolidação e uma linha radiotransparente, evidenciando cartilagem e tecido fibroso, sem formação de calo efetivo (Schmaedecke et al., 2003; Johnson, 2014).

As não uniões inviáveis são avasculares, não reativas, tornando a união clínica muito mais difícil de ser alcançada (Piermattei et al., 2009). São biologicamente inativas, mesmo com a estabilização adequada. Podem ser

subdivididas em distróficas, necróticas (sequestro), defeito e atróficas (Rovesti, 2005; Krauss e Bayer, 2012). A não união atrófica é o resultado final das uniões não viáveis, ocorrendo reabsorção do osso morto da área de fratura e interrupção completa da restauração óssea (Brownlow et al., 2002; Krauss e Bayer, 2012).

Alguns dos fatores importantes no tratamento das não uniões incluem estabilidade no foco de fratura e estimulação biológica do osso. A terapia objetiva a criação de um ambiente mecânico e biológico favorável à consolidação óssea. O canal medular encontra-se fechado, necessitando de intervenção com o intuito de remover o tecido fibroso e torná-lo comunicante. O estabelecimento de fixação cirúrgica rígida e duradoura é mandatório, assim como a enxertia massiva (Dinopoulos e Giannoudis, 2007; Johnson, 2014).

Algumas opções de terapias inovadoras estão em uso, clínico ou experimental (Berner et al., 2012). O uso de moléculas biologicamente ativas é indicado para a melhora da osteoindução e regeneração óssea. Como exemplo, há o uso de fatores de crescimento, que direcionam o desenvolvimento das estruturas e estimulam a angiogênese. Alguns desses fatores são o TGF- β (fator de crescimento transformante), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), encontrados no plasma rico em plaquetas (PRP). O IGF I e II (fator de crescimento semelhante à insulina) e as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) também são utilizados com o objetivo de melhorar a cicatrização óssea (Janicki e Schmidmaier, 2011; Vo et al., 2012).

Da mesma forma, a terapia com células tronco mesenquimais (CTM) também têm sido utilizada para o reparo de fraturas, visto que tais células possuem a capacidade de se diferenciar em células osteogênicas, podendo ser cultivadas e aplicadas a fim de estimular a consolidação do osso (Knight e Hankenson, 2013).

2.3. Decanoato de nandrolona

A Nandrolona é um esteroide sintético derivado da testosterona e apresenta menor toxicidade ao fígado devido a uma reação química que ocorre na porção β -C17 da testosterona. Liga-se aos receptores intracelulares andrógenos por afinidade, de forma semelhante à testosterona, exercendo seus efeitos anabólicos, tais como o aumento da síntese proteica. Desse modo, pode apresentar-se como boa alternativa no tratamento de afecções ósseas (Cavalari, 2011).

Os hormônios esteroides são de extrema importância para a saúde dos ossos, entretanto, seus mecanismos de ação são muito controversos. *In vitro*, as células osteoblásticas parecem ser estimuladas com o uso de andrógenos, porém seu uso *in vivo* requer mais estudos, devido aos efeitos colaterais. O decanoato de nandrolona é utilizado para prevenção de osteopenia, aumento da massa óssea em diversos animais e tratamento de osteoporose em humanos (Abedi et al., 2012).

Em humanos, utiliza-se o decanoato de nandrolona em pacientes infectados pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) com o intuito de aumentar a massa muscular e o peso corporal, bem como em pacientes submetidos à hemodiálise renal. Há evidências ainda do seu uso para a redução de fraturas em mulheres com osteoporose (Vieira et al., 2008).

O decanoato de nandrolona já foi muito utilizado para reparar a massa magra, prevenir a osteoporose e corrigir a resposta imune em humanos, porém há poucos estudos que avaliam a sua eficácia na consolidação óssea (Ahmad et al., 2013).

Em um estudo realizado por Marques (2016), utilizou-se o decanoato de nandrolona em cães no tratamento de osteotomias para o avanço da tuberosidade da tíbia, comparando o uso isolado da nandrolona (na dose de 2mg/kg a cada 21 dias), o uso de enxertos ósseos autólogos e o uso combinado de ambos. Os resultados obtidos demonstraram que o uso isolado de decanoato de nandrolona apresenta tempo inferior para a consolidação óssea quando comparado ao uso de enxerto ósseo autólogo.

Um resultado semelhante foi observado no estudo de Ahmad et al. (2013), onde avaliaram o uso do decanoato de nandrolona na consolidação óssea de fraturas de tíbia induzidas em coelhos. A dose utilizada no presente estudo foi de 10mg/kg de nandrolona, duas vezes por semana durante 2 e 4 semanas, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que ambos os grupos tiveram consolidação óssea relevante, porém notou-se melhor atividade de proliferação osteoblástica e de colágeno nos grupos experimentais, acompanhada do aumento da fosfatase alcalina nos mesmos.

No estudo de Abedi et al. (2012), coelhos foram submetidos à perfuração da tíbia, comparando o uso de decanoato de nandrolona (2mg/kg) e ciproterona (5mg/kg), sendo avaliado o processo de consolidação por radiografias. Os resultados mostraram que até o 30º dia não foram obtidos resultados significativos, entretanto, após este período observou-se uma melhora na consolidação óssea quando usado o decanoato de nandrolona.

As não uniões ósseas apresentam-se com certa frequência na rotina da clínica de pequenos animais, sendo as fraturas de rádio mais acometidas por tal afecção. Diante deste fato, faz-se necessário a busca por terapias alternativas, visto que a maioria delas necessita de intervenção cirúrgica.

3. HIPÓTESES

A principal hipótese desse trabalho é que a utilização do decanoato de nandrolona após a realização do defeito segmentar e estabelecida a não união óssea, potencialize o processo de regeneração óssea, tornando-o mais rápido e eficaz, sendo também alternativa não-cirúrgica no tratamento de não uniões ósseas inviáveis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Avaliar o uso do decanoato de nandrolona para o tratamento de não união óssea inviável por defeito ósseo segmentar induzido experimentalmente em coelhos, por meio de análise radiográfica, histopatológica e densitométrica.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos radiográficos, histológicos e densitométricos do tecido ósseo formado antes e após o tratamento com decanoato de nandrolona, induzido no rádio de coelhos da raça Nova Zelândia Branco (*Oryctolagus cuniculus*).
- Avaliar se o tratamento com decanoato de nandrolona auxiliou no processo de regeneração óssea em comparação com o tratamento placebo.
- Avaliar se o decanoato de nandrolona pode ser uma alternativa não-cirúrgica para o tratamento de não uniões ósseas inviáveis.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Toda metodologia do presente estudo fora realizada de acordo com as normas internacionais de bem-estar animal após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal - SP (Protocolo 019155).

5.1. Instalações

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados junto ao Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Os exames radiográficos foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV. As análises histológicas e densitométricas foram realizadas junto ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal.

5.2. Animais

Foram utilizados 47 coelhos da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia Branco, sendo 24 machos e 24 fêmeas, adultos jovens (160 a 170 dias de idade), não castrados, com peso de 3,8 kg ($\pm 0,3$), oriundos do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – campus de Botucatu/SP. Os leporídeos foram mantidos em gaiolas individuais próprias à cultura de coelhos no Setor de Cunicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - campus de Jaboticabal/SP (Figura 1). Todos foram vermifugados com solução oral de toltrazuril¹ na dose de 15mg/kg por dois dias, havendo repetição da dose após 5 dias. A alimentação foi à base de ração² adequada à espécie, água e feno de tifton (*Cynodon spp.*) *ad libitum*.

5.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em seis grupos de 8 animais cada, designados Controle Machos (GCM), Controle Fêmeas (GCF), Nandrolona

¹ Baycox® 5%, Bayer, São Paulo/Brasil.

² Fri-Coelho, FRI-RIBE, Trouw Nutrition, São Paulo/Brasil.

Machos (GNM), Nandrolona Fêmeas (GNF), Placebo Machos (GPM) e Placebo Fêmeas (GPF).

Os animais dos grupos GCM e GCF foram submetidos à eutanásia no 45º dia pós-operatório (antes do tratamento), sendo então o grupo controle nas análises histológicas e densitométricas.

Nos grupos GNM e GNF foi administrado o Decanoato de Nandrolona³ na dose de 10 mg/kg (IM), uma vez por semana, durante quatro semanas, quando radiograficamente estabeleceu-se a não união óssea (45 dias pós-operatório). Nos grupos GPM e GPF os animais receberam a aplicação intramuscular solução de NaCl 0,9%⁴ uma vez por semana, durante 4 semanas quando radiograficamente estabeleceu-se a não união óssea (aos 45 dias pós-operatório).

Foram avaliados nos diferentes tratamentos os parâmetros radiográficos, histopatológicos e densitométricos.

Realizou-se a comparação dos resultados obtidos entre os grupos de machos (GNM X GPM) e os grupos de fêmeas (GNF X GPF) na avaliação radiográfica, e nas demais análises foram comparados todos os seis grupos entre si.

Um animal do GCM veio a óbito por causa desconhecida durante o tratamento, foi excluído do estudo e não repostado, totalizando 47 animais avaliados.

5.4. Procedimento cirúrgico

5.4.1. Pré-operatório

Foi realizado um período de adaptação ao local de manutenção dos coelhos, e para que os animais alcançassem o desenvolvimento completo do sistema musculoesquelético (aproximadamente 5 meses), devido ao fato de que a maturação sexual dos coelhos se dá entre 150 a 180 dias de idade. Não foi realizado jejum de água ou alimento previamente à cirurgia.

³ DECA-DURABOLIN®, Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda., São Paulo/Brasil

⁴ Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®- Goiânia

5.4.2. Anestesia

Todos os 47 coelhos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Os animais foram pré-medicados com meperidina⁵ na dose de 5 mg/kg por via intramuscular (IM). A indução foi realizada com isoflurano⁶ 3V% por meio de máscara facial e posterior intubação orotraqueal. O plano anestésico foi monitorado com auxílio de monitor multiparamétrico⁷ veterinário, sendo aferida a frequência cardíaca e respiratória, saturação parcial de oxigênio, pressão arterial sanguínea e temperatura retal. Quando julgou-se necessário pelo anestesista (aumento da frequência cardíaca e respiratória ou pressão arterial sistólica), administrou-se *bolus* de fentanil⁸ (2ug/Kg).

5.4.3. Cirurgia

Os animais foram submetidos à tricotomia do membro torácico direito até altura da escápula, região na qual fora realizada antissepia pré cirurgica com clorexidine 2%⁹ e clorexidine alcoólico 0,5%¹⁰, protegendo a extremidade do membro com atadura estéril. Os coelhos foram então posicionados em decúbito lateral direito com o membro torácico direito estendido lateralmente.

Realizou-se uma incisão na pele de aproximadamente 2,5 centímetros na região craniomedial do rádio (Figura 1), com posterior divulsão de subcutâneo e afastamento da musculatura, permitindo a visualização da diáfise do rádio. Com auxílio de um especímetro fora demarcado o comprimento de 10 milímetros na diáfise do rádio, local este onde foi realizada a ostectomia parcial com o uso de uma serra oscilatória¹¹ (Figura 1) e irrigação local com solução de NaCl a 0,9%, evitando o superaquecimento do osso.

⁵ Dolosal®, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo/Brasil.

⁶ Isoforine® 100%. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo/Brasil.

⁷ DIGICARE®, DIGICARE Animal Health, Rio de Janeiro/SP

⁸ UNIFENTAL®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Minas Gerais/Brasil

⁹ RIOHEX® 2% - Solução degermante. Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Paulo/ Brasil.

¹⁰ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica. Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Paulo/ Brasil.

¹¹ Dentscler, São Paulo/Brasil.

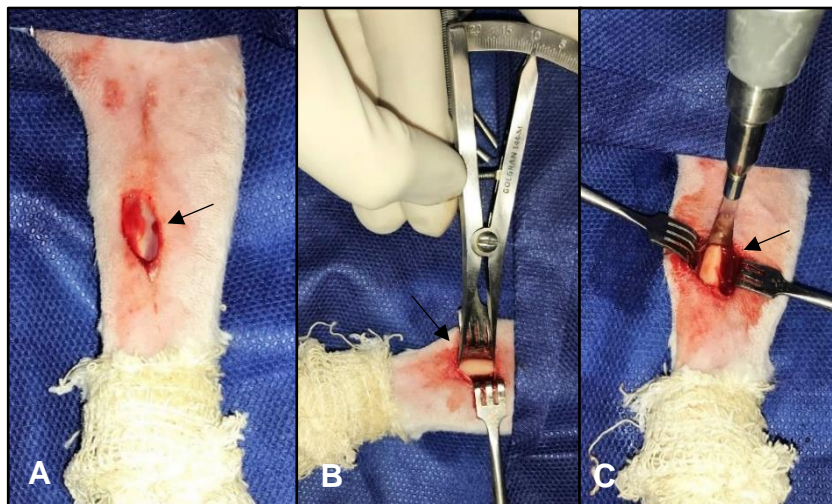


Figura 1. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). A: Incisão de pele. B: Mensuração de 10mm com especímetro. C: Secção do osso realizada com serra oscilatória. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da FCAV.

Após o corte, o segmento ósseo juntamente com o seu periósteo foi retirado e descartado, formando uma falha óssea de 1 cm. A musculatura e pele foram suturadas com nylon 4-0 (Figura 2). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único cirurgião, com experiência na área de cirurgia geral e ortopedia veterinária.

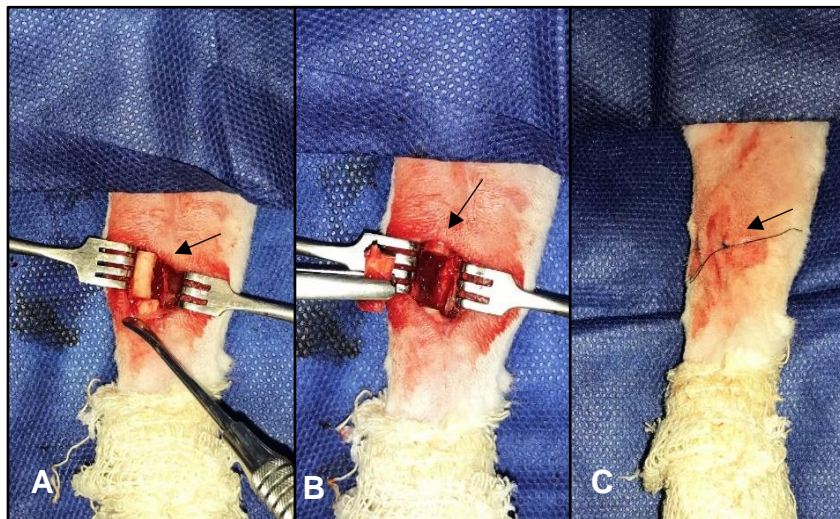


Figura 2. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) A: ostectomia parcial do rádio realizada com serra oscilatória. B: Osso após a retirada do fragmento do rádio. C: Sutura realizada. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da Unesp/FCAV.

5.4.4. Pós-operatório

No período pós-operatório imediato foi iniciada a terapia antimicrobiana com enrofloxacino¹² (10mg/Kg), diluído em solução de NaCl a 0,9% (razão de 1 de enrofloxacino para 5 de solução de NaCl a 0,9%) por via subcutânea, mantendo a terapia uma vez ao dia (SID) durante o período de 7 dias.

Após quatro horas depois da realização da medicação pré-anestésica, foi feito resgate analgésico com morfina¹³ na dose de 2mg/kg (IM). Para analgesia, os animais receberam cloridrato de tramadol¹⁴, na dose de 5mg/kg por via SC, duas vezes ao dia (BID) durante três dias e tratamento anti-inflamatório com meloxicam¹⁵ na dose de 1mg/kg (SC), logo após o procedimento cirúrgico em uma única dose.

¹² Zelotril® 10%, Agener União Saúde Animal, São Paulo/Brasil.

¹³ Dimorf I®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo/Brasil.

¹⁴ Cloridrato de tramadol, Teuto, Goiás/Brasil.

¹⁵ Maxican® 0,2%, Ouro Fino, São Paulo/Brasil.

5.5. Avaliação pré e pós-tratamento

5.5.1. Avaliação radiográfica

Os animais de ambos os grupos foram submetidos à realização de exames radiográficos¹⁶ no período de pós-operatório imediato (P.O), aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico (Figuras 4 e 5). Realizou-se a avaliação duplo cego das imagens radiográficas por dois avaliadores distintos, experientes e que desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental de cada animal.

Com o auxílio de escore, qualificou-se a evolução do processo da não união óssea nos animais e posteriormente a evolução do quadro após a administração do Decanoato de Nandrolona. Para a análise, foram utilizadas as médias dos valores registrados. Reação periosteal (Quadro 1), volume de calo ósseo (Quadro 2), qualidade de ponte óssea (Quadro 3) entre os fragmentos foram os parâmetros semiquantitativos usados para a avaliação.

Realizou-se as projeções mediolateral e craniocaudal do membro torácico direito de cada animal. A técnica utilizada foi com mA= 100, KV= 40 e mAs = 3,2.

Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro reação periosteal. (Adaptado de An et al., 1999; Öztürk et al., 2008).

Escore	Características radiográficas
1	Ausência de reação periosteal
2	Discreta reação periosteal
3	Moderada reação periosteal
4	Intensa reação periosteal

¹⁶ Siemens RG150/100 GL.

Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro volume do calo ósseo. (Adaptado de AN et al., 1999; Öztürk et al., 2008).

Volume do calo ósseo	
Escore	Características radiográficas
1	0 a 25% da falha óssea preenchida com calo ósseo
2	25 a 50% da falha óssea preenchida com calo ósseo
3	50 a 75% da falha óssea preenchida com calo ósseo
4	75 a 100% da falha óssea preenchida com calo ósseo

Quadro 3: Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea. (Adaptado de An et al., 1999; Öztürk et al., 2008).

Qualidade da ponte óssea	
Escore	Características radiográficas
1	Ausência de ponte óssea entre os fragmentos do rádio
2	Formação de discreta ponte óssea na região ventrolateral do rádio (ligamento interósseo)
3	Formação de ponte óssea de espessura inferior ao diâmetro da diáfise do rádio, restabelecendo a coluna óssea
4	Formação de ponte óssea de espessura igual ou superior ao diâmetro da diáfise do rádio, restabelecendo a coluna óssea

5.5.2 Avaliação densitométrica e histológica

Os coelhos dos grupos GCM e GCF foram submetidos à eutanásia ao 45º dia e os grupos GNM, GNF, GPM e GPF aos 90 dias após o procedimento cirúrgico. Realizou-se primeiramente a sedação com midazolam¹⁷ (2mg/kg) por

¹⁷ Dormonid®, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro/Brasil

via IM, seguida pela infusão intravenosa de propofol¹⁸ suficiente para parada respiratória e, em seguida, infusão de cloreto de potássio¹⁹ intravenoso, suficiente para parada cardíaca.

Imediatamente após a eutanásia, realizou-se o exame de densitometria óssea²⁰ do rádio e ulna dissecados. Os ossos foram pesados e tiveram seus tamanhos mensurados com uma fita milimetrada comum. O equipamento foi calibrado com o uso de um phantom, com medidas específicas para análise óssea, sendo então o osso posicionado na mesa e escaneado numa área de 30 cm, fornecendo resultados de conteúdo da composição mineral óssea (g) e densidade mineral óssea (g/cm²) (Figura 5).

Após a realização do exame de densitometria, foram coletados segmentos do membro torácico direito dos animais (rádio e ulna), sendo as osteotomias realizadas em aproximadamente 1 cm proximal e distal das interfaces da falha óssea, para exame histológico.

Preparou-se o tecido ósseo com a técnica de descalcificação, sendo inicialmente fixado em formol tamponado a 4% durante 72 horas, em seguida o material foi colocado em solução de ácido nítrico 8% com volume 100 vezes maior ao da peça. O tecido permaneceu nesta solução até atingir ponto de corte.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizados em xilol. Após, foram inclusas em parafina e realizadas secções semisseriadas no micrótomo a 5 µm, sendo então coradas pela técnica de HE e TM. As lâminas histológicas obtidas foram observadas ao microscópio de luz para avaliação da neoformação dos tecidos fibrosos, cartilagosos, osso jovem e maduro durante o processo de cicatrização óssea.

Na avaliação macroscópica, foi realizada classificação qualitativa por escore (de 1 a 4) de acordo com o grau de união de cada amostra do rádio direito dos animais avaliados, sendo 1 = falha óssea não unida, 2 = falha óssea discretamente unida, 3 = falha óssea moderadamente unida e 4 = falha óssea unida.

¹⁸ Propovan®/ Cristália – Itapira-SP

¹⁹ Solução de cloreto de potássio 19,1% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®, Goiânia/Brasil

²⁰ Equipamento DXA, do modelo Hologic Discovery Wi® 13.4.2, software no modo small animal.

As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 1 a 4, sendo 1 = ausência, 2 = discreta quantidade, 3 = moderada e 4 = acentuada quantidade. Os aspectos microscópicos caracterizados por esses escores foram: macroscopia, tecido de granulação, presença de osteoblastos e fibras colágenas, presença de osso não mineralizado, formação de tecido cartilaginoso, formação de osso lamelar (osso maduro) e composição do canal medular. As avaliações foram realizadas por uma patologista experiente na área.

6. Análise estatística

Os dados obtidos foram primeiramente submetidos à análise estatística descritiva, obtendo-se média, mediana, valor máximo e valor mínimo.

Para as variáveis categóricas (escore de avaliação radiográfica e de avaliação histológica) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), sendo que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) as diferenças foram consideradas significativas.

Para análise da variável densitometria óssea (paramétrica) foi utilizado o teste Shapiro-Wilk, sendo que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) as diferenças foram consideradas significativas.

Havendo diferença significativa entre médias, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Para tanto, foram utilizados os pacotes “agricolae” e “ExpDes”, ambos do programa computacional R²¹.

7. REFERÊNCIAS

Abedi G, Alizadeh R, Asghari A, Sedghani P (2012) Radiographic evaluation of androgen on tibial bone defect healing in rabbit. **European Journal of Experimental Biology** 2(4):1315-1319.

²¹ R Core Team (2018) - R Foundation for Statistical Computing, Vienna/Áustria.

Ahmad F, Yunus SM, Asghar A, Faruqi NA (2013) Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits—a study on experimental model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR** 7(1):93.

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of dental research** 87(2):107-118.

An YH (1999). Animal models of bone fracture or osteotomy. **Animal models in orthopaedic research** 205-208.

Berner A, Reichert JC, Müller MB, Zellner J, Pfeifer C, Dienstknecht T, Füchtmeier B (2012) Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. **Cell and tissue research** 347(3):501-519.

Brownlow HC, Reed A, Simpson AHR (2002) The vascularity of atrophic non-unions. **Injury**, 33(2): 145-150 p.

Cavalari FC (2011) **Ação de andrógenos e catequina sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos Wistar imaturos**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Collignon AM, Lesieur J, Vacher C, Chaussain C, Rochefort GY (2017) Strategies developed to induce, direct, and potentiate bone healing. **Frontiers in physiology** 8:927.

Dinopoulos H, Giannoudis PV (2007) The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. **Current orthopaedics** 21(4):268-279.

Janicki P, Schmidmaier G (2011) What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. **Injury** 42: S77-S81.

Johnson AL (2014) Cirurgia de pequenos animais. Rio de Janeiro: Elsevier. 823-899 p.

Johnson AL, Houlton JE, Vannini R (2005) AO principles of fracture management in the dog and cat. Suíça: AO Publishing. 72-97 p.

Knight MN, Hankenson KD (2013) Mesenchymal stem cells in bone regeneration. **Advances in wound care** 2(6):306-316.

Krauss KH, Bayer BJ (2012) Veterinary Surgery Small Animal. Elsevier. 1961-1983 p.

Marques DRC (2016) **Interferência do Deca-Durabolin na consolidação óssea em osteotomia para o avanço da tuberosidade da tíbia**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Massie AM, Kapatkin AS, Fuller MC, Verstraete FJ, et al. (2017) Outcome of nonunion fractures in dogs treated with fixation, compression resistant matrix, and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 30(02): 153-159.

Munakata S, Nagahiro Y, Katori D, Muroi N, Akagi H, Kanno N, et al. (2018). Clinical Efficacy of Bone Reconstruction Surgery with Frozen Cortical Bone Allografts for Nonunion of Radial and Ulnar Fractures in Toy Breed Dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 31(03):159-169.

Öztürk A, Ilman AA, Saglam H, et al. (2008) The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery** 14(1): 21-27.

Perren SM (2002) Evolution of the internal fixation of long bone fractures: the scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. **The Journal of bone and joint surgery** British volume, 84(8): 1093-1110.

Piermattei DL, Flo GL, Brinker WO (2009) Ortopedia e Tratamento de Fraturas de Pequenos Animais. São Paulo: Manole 4 p.

Rovesti GL (2005) AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat. Suíça: AO Publishing 394-409 p.

Schmaedecke A, Aceto ML, de Queiróz GF, Tatarunas AC, Zerwes MBC, Mastrocinque S, Ferrigno CRA (2003) Tratamento cirúrgico de união retardada e não-união de fraturas em cães: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 6(1/3): 74-82.

Tan HB, Giannoudis PV, Boxall SA, McGonagle D, Jones E (2015) The systemic influence of platelet-derived growth factors on bone marrow mesenchymal stem cells in fracture patients. **BMC medicine** 13(1): 6.

Tsai KL (2017) Case report: three cases of non-union fracture in dogs treated with adipose-derived adult stem cells combined with autologous cancellous bone and synthetic bone substitutes. **Taiwan Veterinary Journal** 43(01): 1-9.

Tudury EA, Souza AF, Fernandes TT, Araújo BM, Oliveira LM, Amorim MM, Silva IC (2017) Desenvolvimento e avaliação de equipamento de tração, para redução de fraturas de ossos longos de cães. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia** 69(4): 933-940.

Vieira, RP, França RF, Damaceno-Rodrigues NR, Dolhnikoff M, Caldini EG, Carvalho CRF, Ribeiro W (2008) Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. **Medicine and Science in Sports and Exercise** 40(5): 842.

Vo TN, Kasper FK, Mikos AG (2012) Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. **Advanced drug delivery reviews** 64(12): 1292-1309.

Yalçinkaya U, Aykut S., Akgöz S, Özkan Y, Yanik K (2008) The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery** 14(1): 21-27

CAPÍTULO 2 – Artigo científico nas normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

USO DO DECANOATO DE NANDROLONA NO TRATAMENTO DA NÃO UNIÃO ÓSSEA EM FRATURAS DO RÁDIO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

USE OF NANDROLONE DECANOATE IN THE TREATMENT OF BONE NON-UNION IN RADIOUS FRACTURES - EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS
(*Oryctolagus cuniculus*)

Adrielly Dissenha.

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, (2016).

RESUMO: O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia do Decanoato de Nandrolona (DN) em fraturas do rádio após indução da não união óssea por defeito segmentar. Foram utilizados 47 coelhos, da raça Nova Zelândia Branco, com peso médio de 3,8 kg, divididos aleatoriamente em grupos de 8 animais. Os grupos Controle Machos (GCM) e Controle Fêmeas (GCF) foram submetidos à eutanásia aos 45 dias, os grupos Nandrolona Machos (GNM) e Nandrolona Fêmeas (GNF) tratados com aplicações semanais de DN na dose de 10mg/kg, via intramuscular (IM) durante 4 semanas. Os Grupos Placebo Machos (GPM) e Grupo Placebo Fêmeas (GPF), tratados com aplicações semanais de NaCl 0,9% (IM), durante o mesmo período. Foi realizado exame radiográfico após a cirurgia e aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. Os animais dos grupos GNM, GNF, GPM e GPF foram submetidos à eutanásia aos 90 dias. Realizou-se exame de densitometria óssea do rádio dissecado após a eutanásia em todos os grupos, bem como análise histológica. Para as variáveis não-paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para as variáveis paramétricas foi utilizado o teste Shapiro-Wilk, ambos a 5% de significância. Radiograficamente, os grupos tratados com DN apresentaram média de escore superior aos demais grupos na formação de calo ósseo. Na análise densitométrica, também foi observada uma melhora significativa ao parâmetro de composição mineral óssea (BMC) nos grupos GNM e GNF. Os machos apresentaram maiores médias para os parâmetros

conteúdo mineral ósseo local (BMCL) e densidade mineral óssea local (BDML). Não houve diferença estatística significativa na avaliação histológica.

Palavras-chave: anabolizante, complicação, cicatrização, dxa, microscopia.

**USO DO DECANOATO DE NANDROLONA NO TRATAMENTO DA NÃO
UNIÃO ÓSSEA EM FRATURAS DO RÁDIO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

USE OF NANDROLONE DECANOATE IN THE TREATMENT OF BONE NON-
UNION IN RADIOUS FRACTURES - EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS
(*Oryctolagus cuniculus*)

Adrielly Dissenha.

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, (2011).

ABSTRACT: The aim of research was to evaluate Nandrolone Decanoate (DN) efficacy in radius fractures after induction of bone nonunion by segmental defect. Forty-seven New Zealand White rabbits weighing 3.8 kg were randomly divided into groups of 8 animals. Male Control Group (GCM) and Female Control Group (GCF) were euthanized at 45 days. Nandrolone Male Group (GNM) and Nandrolone Female Group (GNF) treated with weekly doses of DN (10mg/kg) intramuscular (IM) for 4 weeks. Placebo Males Groups (GPM) and Placebo Females Group (GPF) treated with weekly applications of 0.9% NaCl (IM) during the same period. A radiographic examination was performed after surgery and at 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days. The groups GNM, GNF, GPM and GPF were euthanized at 90 days. Bone densitometry of dissected radius after euthanasia was performed in all groups as well as histological analysis. For nonparametric variables was used Kruskal-Wallis test. For parametric variables used Shapiro-Wilk test, both at 5% significance level. Radiographically groups were treated with DN presented higher average score than other groups in bone callus formation. In densitometric analysis a significant improvement in bone mineral composition (BMC) was also observed in GNM and GNF groups. Males showed higher media for local bone mineral content (BMCL) and local bone mineral density (BDML). There was no statistically significant difference in histological evaluation.

Key words: anabolic, complication, healing, dxa, microscopy.

INTRODUÇÃO

O esqueleto é composto por ossos rígidos constituídos por tecido ósseo, medula óssea, endóstio, perióstio, cartilagem, nervos e canais vasculares, podendo ser dividido em 60 a 70% de porção inorgânica, 5 a 10% de água e o restante, composto por uma matriz orgânica de células, colágeno e proteínas (Collignon et al., 2017).

Uma fratura ocorre quando há perda da continuidade da superfície óssea ou cartilaginosa, completa ou incompletamente. Gera lesões aos tecidos moles adjacentes, comprometendo a vascularização do mesmo e, potencialmente, a função do membro (Piermattei et al., 2009).

As fraturas de ossos longos em pequenos animais são uma das maiores casuísticas na rotina cirúrgica de pequenos animais. Na maioria dos casos, intervenções cirúrgicas são necessárias para estabilização dessas fraturas, criando um ambiente favorável à consolidação óssea e acelerando o processo natural de reparação. Algumas vezes essas intervenções não são suficientes para que o organismo consiga promover a consolidação, seja por fatores extrínsecos (falha do implante, estabilização pobre ou exacerbada) ou intrínsecos (idade do paciente, sexo, afecções concomitantes, infecções, entre outros) (Marques et al., 2016).

Uma das complicações mais comuns nas osteossínteses de ossos longos, é, sem dúvida, as uniões retardadas e as não uniões ósseas. Estas complicações são identificadas quando há uma demora maior do que a esperada para que o osso se consolide (união retardada) ou quando não é oferecido ao osso o ambiente necessário para consolidação, a qual não ocorre (não união). Estas geralmente ocorrem quando há excesso de movimentação no foco da fratura e/ou a presença de grandes falhas ósseas (Tsai 2016; Massie et al., 2017).

A não união óssea afeta, principalmente, regiões onde a vascularização e a cobertura muscular perióssea é escassa. Segundo Munakata et al. (2017), o rádio e a ulna são os ossos mais acometidos por não união óssea quando fraturados (em torno de 60% dos casos), seguido da tíbia que é afetada em 25% dos casos. A intervenção cirúrgica é por muitas vezes necessária, visando o debridamento do osso e uma estabilização mais eficaz para que haja o reparo.

Um dos grandes desafios do tratamento das não uniões não viáveis é a bioativação do ambiente de fratura. Classicamente, o uso de enxertos ósseos, medula óssea e outros fatores de ativação tem sido utilizados, entretanto porcentagens alarmantes de insucesso ainda são observadas, especialmente em cães de porte pequeno; e miniatura (Dinopoulos e Giannoudis, 2007; Krauss e Bayer, 2012).

Os hormônios esteroides são de extrema importância para a saúde dos ossos. In vitro, as células osteoblásticas parecem ser estimuladas com o uso de andrógenos. Partindo deste ponto, muitos estudos têm sido realizados utilizando esteroides anabolizantes como auxiliar à reparação óssea. Embora o mecanismo de ação desses fármacos não tenha sido claramente elucidado, acredita-se que estes sejam capazes de estimular a osteoblastogênese, inibindo a ação dos osteoclastos e acelerando a consolidação óssea. O decanoato de nandrolona é um esteroide utilizado para prevenção e tratamento da osteopenia, bem como no aumento da massa óssea em diferentes animais, porém seu uso *in vivo* requer mais estudos (Abedi et al., 2012; Marques, 2016).

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados junto ao Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Os exames radiográficos foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV. As análises histológicas e densitométricas foram realizadas junto ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal.

Foram utilizados 48 coelhos da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia Branco, sendo 24 machos e 24 fêmeas, adultos jovens (160 a 170 dias de idade), não castrados, com peso de 3,8 kg ($\pm 0,3$), oriundos do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – campus de Botucatu/SP. Os leporídeos foram mantidos em gaiolas individuais próprias à cultura de coelhos no Setor de Cunicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - campus de Jaboticabal/SP (Fig. 1). Todos foram vermifugados com solução oral de toltrazuril (Baycox®, toltrazuril 5%, Bayer, São Paulo/Brasil) na dose de 15mg/kg por dois dias, havendo repetição da dose após cinco dias. A alimentação foi à base de ração (Fri-Coelho, FRI-RIBE, Trouw Nutrition, São Paulo/Brasil) adequada à espécie, água e feno de tifton (*Cynodon spp.*) *ad libitum*.

Foi realizado um período de adaptação ao local de manutenção dos coelhos, e para que os animais alcançassem o desenvolvimento completo do sistema musculoesquelético (aproximadamente 5 meses), devido ao fato de que a maturação sexual dos coelhos se dá entre 150 a 180 dias de idade (COUTO, 2002).

Os animais foram distribuídos em seis grupos de 8 animais cada, designados Controle Machos (GCM), Controle Fêmeas (GCF), Nandrolona Machos (GNM), Nandrolona Fêmeas (GNF), Placebo Machos (GPM) e Placebo Fêmeas (GPF).

Os coelhos dos grupos GCM e GCF foram submetidos a eutanásia no 45º dia pós-operatório (antes do tratamento), sendo então o grupo controle nas análises histológicas e densitométricas.

Nos grupos GNM e GNF foi administrado o decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®, Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda, São Paulo/Brasil) na dose de 10 mg/kg (IM), uma vez por semana, durante quatro semanas, quando radiograficamente estabeleceu-se a não união óssea (45 dias pós-operatório). Nos grupos GPM e GPF os animais receberam a aplicação intramuscular solução de NaCl 0,9% (Deca-Durabolin®, cloreto de sódio 0,9%, Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda., São Paulo/Brasil) uma vez por semana, durante quatro semanas quando radiograficamente estabeleceu-se a não união óssea (aos 45 dias pós-operatório).

Foram avaliados nos diferentes tratamentos os parâmetros radiográficos, histopatológicos e densitométricos. Realizou-se a comparação dos resultados obtidos entre os grupos de machos (GNM X GPM) e os grupos de fêmeas (GNF X GPF) na avaliação radiográfica, e nas demais análises foram comparados todos os seis grupos entre si.

Todos os coelhos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Não foi realizado jejum de água ou alimento previamente à cirurgia. Os animais foram pré-medicados com meperidina (Dolosal®, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo/Brasil) na dose de 5 mg/kg por via intramuscular (IM). A indução foi realizada com isoflurano (Isoforine® 100%, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo/Brasil) 3V% por meio de máscara facial e posterior intubação orotraqueal. O plano anestésico foi monitorado com auxílio de monitor multiparamétrico (DIGICARE®, DIGICARE Animal Health, Rio de Janeiro/SP) veterinário, sendo aferida a frequência cardíaca e respiratória, saturação parcial de oxigênio, pressão arterial sanguínea e temperatura retal. Quando julgou-se necessário pelo anestesista (aumento da frequência cardíaca e respiratória ou pressão arterial sistólica), administrou-se *bolus* de fentanil (2µg/Kg) (UNIFENTAL®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Minas Gerais/Brasil).

Os animais foram submetidos à tricotomia do membro torácico direito até altura da escápula, região na qual foi realizada antissepsia pré cirúrgica com clorexidina 2% (RIOHEX®

2% - Solução degermante. Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Paulo/ Brasil) e clorexidine alcoólico 0,5% (RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica. Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Paulo/ Brasil), protegendo a extremidade do membro com atadura estéril (os coelhos foram então posicionados em decúbito lateral direito com o membro torácico direito estendido lateralmente).

Realizou-se uma incisão na pele de aproximadamente 2,5 centímetros na região craniomedial do rádio, com posterior divulsão de subcutâneo e afastamento da musculatura, permitindo a visualização do rádio. Com o auxílio de um espécímetro fora demarcado o comprimento de 10 milímetros na diáfise do rádio, local este onde foi realizada a ostectomia parcial com o uso de uma serra oscilatória (Dentscler, São Paulo/Brasil) e irrigação local com solução de NaCl a 0,9%, evitando o superaquecimento do osso (Fig. 1).

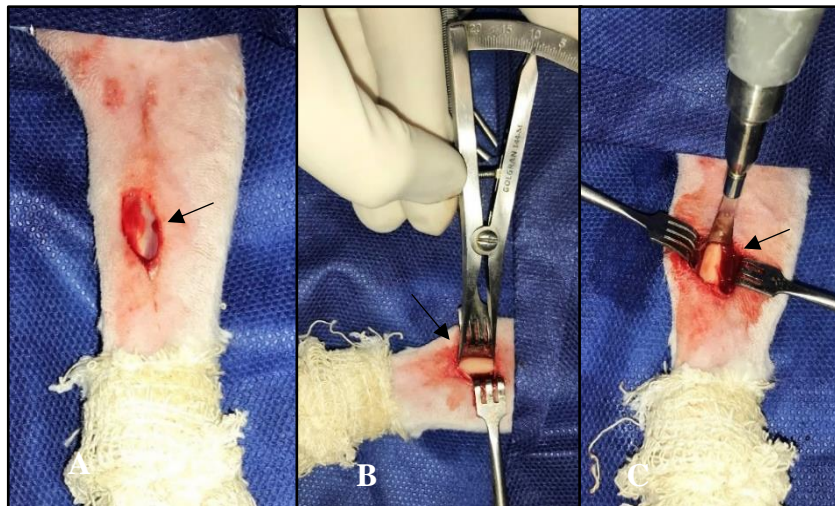


Figura 1. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). A: Incisão de pele. B: Mensuração de 10mm com espécímetro. C: Secção do osso realizada com serra oscilatória. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da Unesp/FCAV.

Após o corte, o segmento ósseo juntamente com o seu perióstio foi retirado e descartado, formando uma falha óssea de 1 cm. A musculatura e pele foram suturadas com nylon 4-0 (Fig. 2). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único cirurgião, com experiência na área de cirurgia geral e ortopedia veterinária.

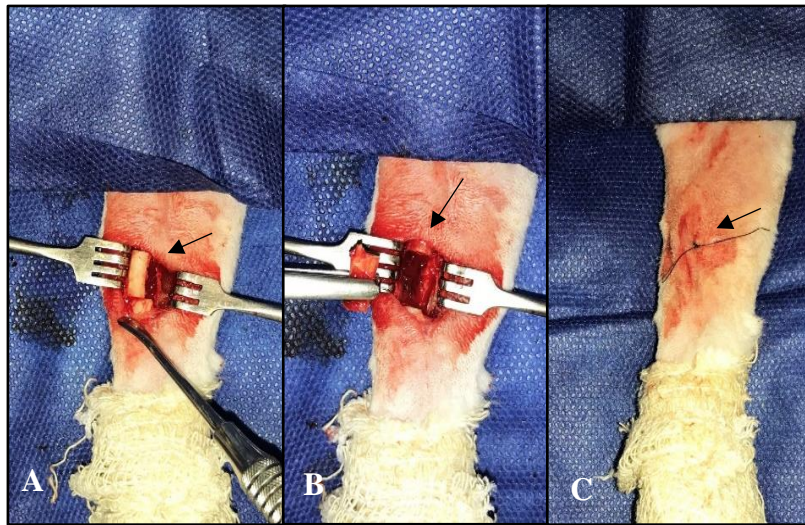


Figura 2. Imagem fotográfica da região craniomedial do rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) **A:** ostectomia parcial do rádio realizada com serra oscilatória. **B:** Osso após a retirada do fragmento do rádio. **C:** Sutura realizada. Fonte: Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária da Unesp/FCAV.

No período pós-operatório imediato foi iniciada a antibioticoterapia com enrofloxacino (10mg/Kg), (Zelotril®, enrofloxacino 10%, Agener União Saúde Animal, São Paulo/Brasil), diluído em solução de NaCl a 0,9% (razão de 1 de enrofloxacino para 5 de solução de NaCl a 0,9%) por via subcutânea, mantendo a terapia uma vez ao dia (SID) durante o período de 7 dias.

Após quatro horas depois da realização da medicação pré-anestésica, foi feito resgate analgésico com morfina (Dimorf I®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo/Brasil) na dose de 2mg/kg (IM). Para analgesia, os animais receberam cloridrato de tramadol (Cloridrato de tramadol, Teuto, Goiás/Brasil), na dose de 5mg/kg por via SC, duas vezes ao dia (BID) durante três dias e tratamento anti-inflamatório com meloxicam (Maxican®, meloxicam 0,2%, Ouro Fino, São Paulo/Brasil) na dose de 1mg/kg (SC), logo após o procedimento cirúrgico em uma única dose.

Os animais de ambos os grupos foram submetidos ao exame radiográfico (Siemens RG150/100 GL) no período de pós-operatório imediato (P.O), aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico. Realizou-se as projeções mediolateral e craniocaudal do membro torácico direito de cada animal. A técnica utilizada foi com mA= 100, KV= 40 e mAs = 3,2.

As imagens foram submetidas à avaliação duplo cego feita por dois avaliadores distintos, experientes e que desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental de cada animal.

Com o auxílio de escore, qualificou-se a evolução do processo da não união óssea nos animais e posteriormente a evolução do quadro após a administração do DN. Para a análise, foram utilizadas as médias dos valores registrados. Reação periosteal (Quad. 1), volume de calo ósseo (Quad.2), qualidade de ponte óssea (Quad.3) entre os fragmentos foram os parâmetros semiquantitativos usados para a avaliação.

Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro reação periosteal. (Adaptado de An *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008).

Escore	Características radiográficas
1	Ausência de reação periosteal
2	Discreta reação periosteal
3	Moderada reação periosteal
4	Intensa reação periosteal

Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro volume do calo ósseo. (Adaptado de AN *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008).

Escore	Características radiográficas
1	0 a 25% da falha óssea preenchida com calo ósseo
2	25 a 50% da falha óssea preenchida com calo ósseo
3	50 a 75% da falha óssea preenchida com calo ósseo
4	75 a 100% da falha óssea preenchida com calo ósseo

Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da cicatrização óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea. (Adaptado de An *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2008).

Escore	Características radiográficas
1	Ausência de ponte óssea entre os fragmentos do rádio
2	Formação de discreta ponte óssea na região ventrolateral do rádio (ligamento interósseo)
3	Formação de ponte óssea de espessura inferior ao diâmetro da diáfise do rádio, restabelecendo a coluna óssea
4	Formação de ponte óssea de espessura igual ou superior ao diâmetro da diáfise do rádio, restabelecendo a coluna óssea

Os grupos GNM, GNF, GPM e GPF foram submetidos à eutanásia aos 90 dias após o procedimento cirúrgico. Realizou-se primeiramente a sedação com midazolam (Dormonid®, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro/Brasil), 2mg/kg por via IM, seguida pela infusão intravenosa de propofol (Propovan®/ Cristália, Itapira-SP/Brasil) suficiente para parada respiratória e, em seguida, infusão de cloreto de potássio (Solução de cloreto de potássio 19,1% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®, Goiânia/Brasil) intravenoso, suficiente para parada cardíaca.

Imediatamente após a eutanásia, realizou-se o exame de densitometria óssea (Equipamento DXA, do modelo Hologic Discovery Wi® 13.4.2, software no modo small animal) do rádio e ulna dissecados. Os ossos foram pesados e tiveram seus tamanhos mensurados com uma fita milimetrada comum. O equipamento foi calibrado com o uso de um phantom, com medidas específicas para análise óssea, sendo então o osso posicionado na mesa e escaneado numa área de 30 cm, fornecendo resultados de conteúdo da composição mineral óssea (g) e densidade mineral óssea (g/cm²) (Fig. 4).

Após a realização do exame de densitometria, foram coletados segmentos do membro torácico direito dos animais (rádio e ulna), sendo as osteotomias realizadas em aproximadamente 1 cm proximal e distal das interfaces da falha óssea, para exame histológico.

Preparou-se o tecido ósseo com a técnica de descalcificação, sendo inicialmente fixado em formol tamponado a 4% durante 72 horas, em seguida o material foi colocado em solução de ácido nítrico 8% com volume 100 vezes maior ao da peça. O tecido permaneceu nesta solução até atingir ponto de corte.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizados em xilol. Após, foram inclusas em parafina e realizadas secções semisseriadas no micrótomo a 5 μm , sendo então coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM). As lâminas histológicas obtidas foram observadas ao microscópio de luz para avaliação da neoformação dos tecidos fibrosos, cartilagosos, osso jovem e maduro durante o processo de cicatrização óssea.

Na avaliação macroscópica, foi realizada classificação qualitativa por escore (de 1 a 4) de acordo com o grau de união de cada amostra do rádio direito dos animais avaliados, sendo 1 = falha óssea não unida, 2 = falha óssea discretamente unida, 3 = falha óssea moderadamente unida e 4 = falha óssea unida.

As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 1 a 4, sendo 1 = ausência, 2 = discreta quantidade, 3 = moderada e 4 = acentuada quantidade. Os aspectos microscópicos caracterizados por esses escores foram: macroscopia, tecido de granulação, presença de osteoblastos e fibras colágenas, presença de osso não mineralizado, formação de tecido cartilaginoso, formação de osso lamelar (osso maduro), vasos sanguíneos e composição do canal medular. As avaliações foram realizadas por uma patologista experiente na área.

Os dados obtidos foram primeiramente submetidos à análise estatística descritiva, obtendo-se média, mediana, valor máximo e valor mínimo.

Para as variáveis categóricas (escore de avaliação radiográfica e de avaliação histológica) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), sendo que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 as diferenças foram consideradas significativas.

Para análise da variável densitometria óssea (paramétrica) foi utilizado o teste Shapiro-Wilk, sendo que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 as diferenças foram consideradas significativas.

Havendo diferença significativa entre médias, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Para tanto, foram utilizados os pacotes “agricolae” e “ExpDes”, ambos do programa computacional R (R Core Team (2018) - R Foundation for Statistical Computing, Vienna/Áustria).

RESULTADOS

Após o procedimento cirúrgico, não foram observadas fístulas, secreções ou inflamação exacerbada no local da incisão. Todos os animais apoiaram o membro já no segundo dia de pós-operatório.

Os animais foram submetidos ao exame radiográfico no pós-operatório imediato, aos 15 e 30 dias - visando acompanhar a evolução da não união óssea – e aos 45, 60, 75 e 90 dias durante o tratamento para as análises (Fig. 7, 8, 9 e 10).

Para o parâmetro “reação periosteal”, foi avaliada a presença de estímulo de reação do perióstio de rádio e/ou da ulna ao redor da falha óssea.

Dentro do GN, as fêmeas obtiveram uma maior média em comparação aos machos, principalmente aos 90 dias, porém sem significância ($p>0,05$).

No GP, as fêmeas obtiveram uma maior média em comparação aos machos, aos 60, 75 e 90 dias (Fig. 3)

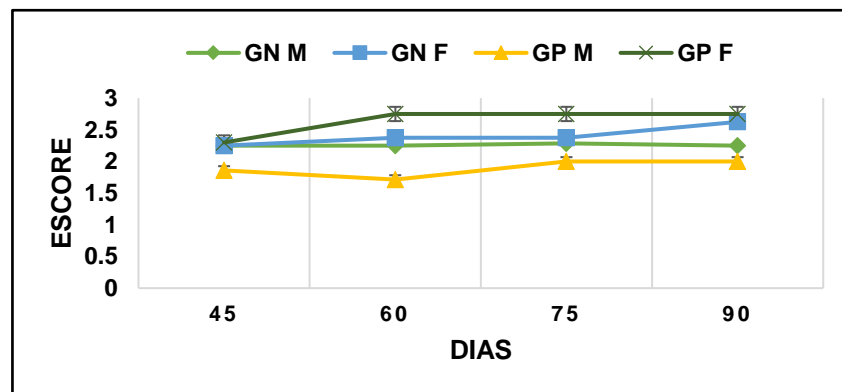


Figura 3. Média e o erro padrão do escore de avaliação radiográfica do parâmetro reação periosteal para os grupos GNM, GN F, GPM e GPF, dos 45 aos 90 dias.

Para o parâmetro radiográfico “volume do calo ósseo”, foi realizada a avaliação volumétrica da presença de calo ósseo na falha óssea do rádio, graduando-a pela porcentagem de preenchimento na falha óssea.

Dentro do GN, os machos obtiveram uma média maior que as fêmeas em todos os momentos. No GP, os machos também apresentaram maior média sobre as fêmeas, porém menor quando comparada aos machos do GN (Fig. 4)

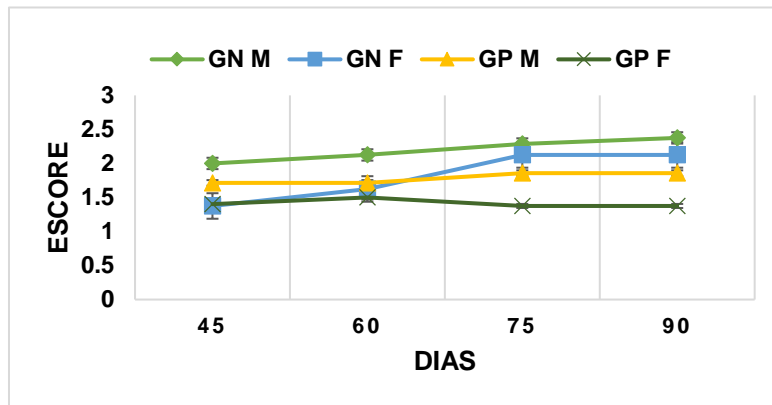


Figura 4. Média e o erro padrão do escore de avaliação radiográfica do parâmetro volume do calo ósseo para os grupos GNM, GNF, GPM e GPF, dos 45 aos 90 dias.

Ao parâmetro radiográfico “qualidade da ponte óssea”, foi avaliada a presença ou não de ponte entre os fragmentos ósseos ao redor da falha, sendo então graduados pela qualidade da coluna do osso.

No GN, os machos (GNM) tiveram uma pequena diferença entre as médias dos machos do grupo placebo (GPM) aos 75 dias. Neste mesmo momento, as fêmeas do grupo nandrolona (GNF) obtiveram médias superiores às fêmeas do grupo placebo (GPF). Aos 90 dias, apenas o grupo GPF obteve média menor que os demais (Fig. 5).

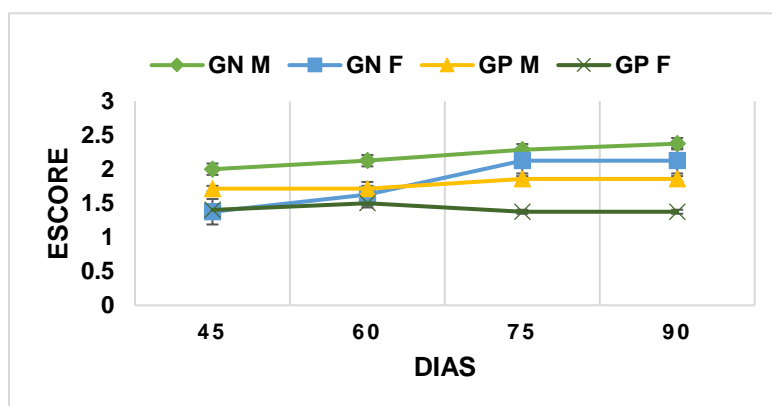


Figura 5. Média e o erro padrão do escore de avaliação radiográfica do parâmetro reação qualidade da ponte óssea para os grupos GNM, GNF, GPM e GPF, dos 45 aos 90 dias.



Figura 6. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna direita do animal GNF4. **A:** Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). **B:** 45 dias de pós-operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). **C:** 60 dias de evolução, na segunda semana de tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar parcialmente preenchido (seta). **D:** Aos 75 dias, mostrando o defeito segmentar parcialmente preenchido (seta). Defeito ósseo segmentar preenchido quase completamente aos 90 dias (seta).



Figura 7. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna direita do animal GNM3. **A:** Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). **B:** 45 dias de pós-operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). **C:** 60 dias de evolução, evidenciando o defeito ósseo segmentar parcialmente preenchido (seta). **D:** Aos 75 dias, mostrando o defeito segmentar preenchido quase completamente (seta). **E:** Defeito ósseo segmentar preenchido quase completamente aos 90 dias (seta).

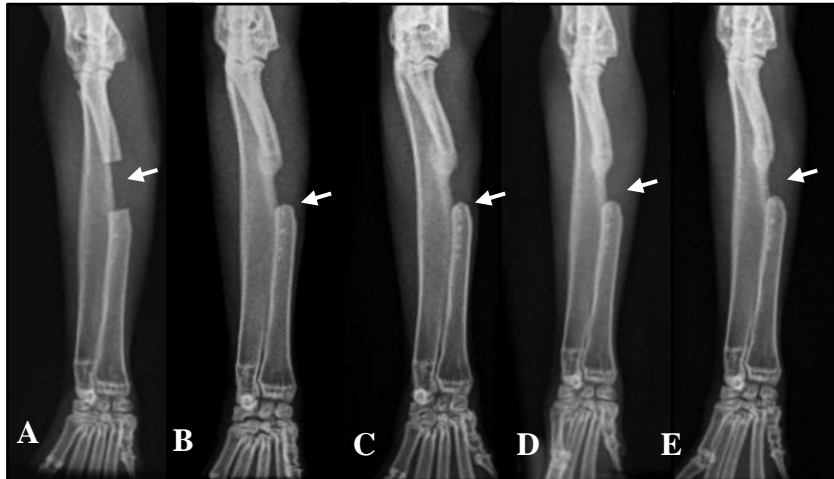


Figura 8. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal de rádio e ulna direita do animal GPM10. **A:** Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). **B:** Aos 45 dias de pós operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). **C:** 60 dias de evolução, evidenciando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal (seta). **D:** Aos 75 dias. Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com diminuição da reação periosteal (seta). **E:** Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio sem reação periosteal (seta) aos 90 dias.

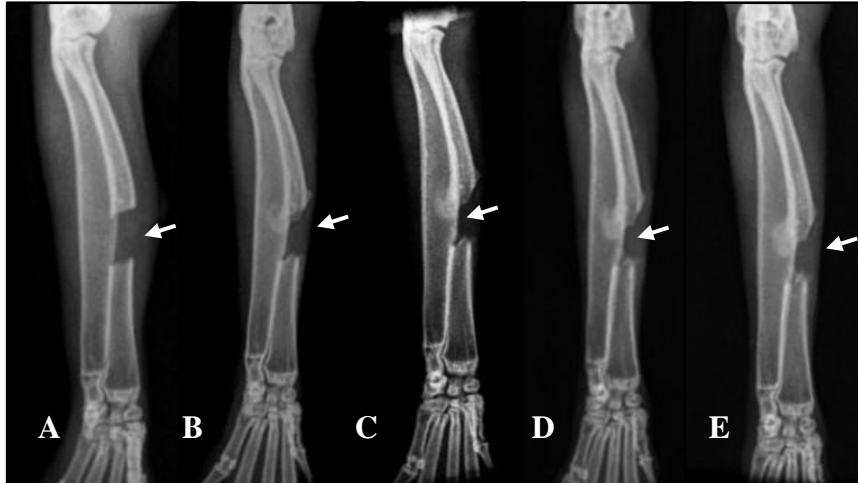


Figura 9. Radiografias mostrando a evolução da cicatrização da falha óssea na projeção craniocaudal de rádio e ulna direita do animal GPF7. **A:** Pós-operatório imediato, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio (seta). **B:** 45 dias de pós-operatório e ao início do tratamento, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com discreta reação periosteal (seta). **C:** Aos 60 dias de evolução, defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com discreta reação periosteal (seta). **D:** Aos 75 dias. Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal não progressiva (seta). **E:** Defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio com reação periosteal não progressiva (seta) aos 90 dias.

Na análise da densitometria óssea, foram avaliados os parâmetros “conteúdo mineral ósseo – BMC”, “densidade mineral óssea – BMD”, “conteúdo mineral ósseo local – BMDL” e “densidade mineral óssea local – BMCL” de todos os grupos. Estes parâmetros visam uma análise quantitativa da massa óssea dos animais avaliados, mostrando as mudanças da massa óssea entre os tratamentos.

Ao parâmetro conteúdo mineral ósseo – BMC, o grupo nandrolona (GNM e GNF) obteve maior média em relação ao grupo controle e ao grupo placebo, sendo ainda o GNF se sobressaindo dentre os demais com uma maior média, com significância ($p < 0,05$) (Fig. 10).

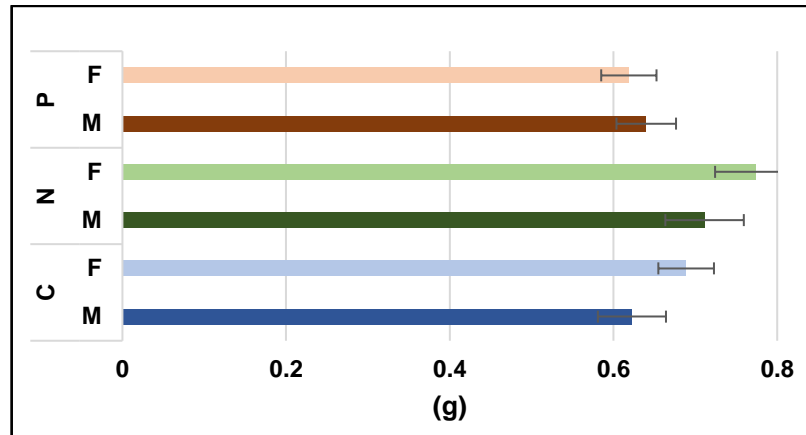


Figura 10. Média e o erro padrão do conteúdo mineral ósseo – BMC, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.

Na avaliação do parâmetro densidade mineral óssea – BMD, os grupos GNF e GCF obtiveram médias discretamente maiores que os demais grupos, sem significância ($p>0,05$) (Fig. 11).

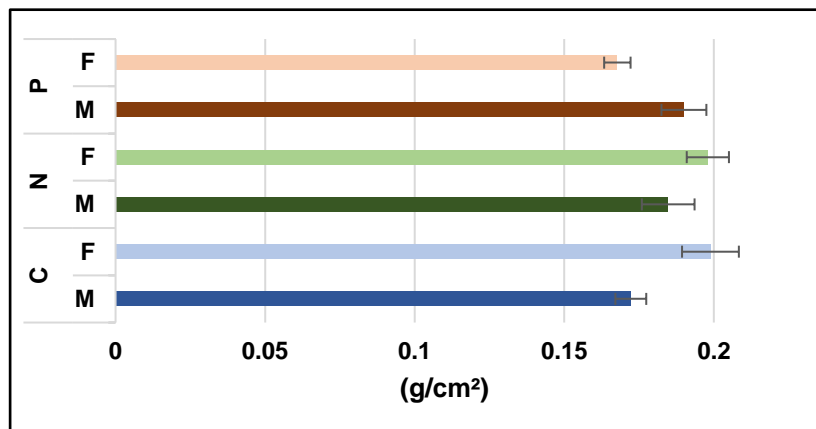


Figura 11. Média e o erro padrão da densidade mineral óssea – BMD, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.

Analisando o conteúdo mineral ósseo local – BMCL, foi possível evidenciar uma média superior nos animais machos tratados com nandrolona (GNM). As fêmeas no geral (GPF, GNF e GCF) apresentaram médias inferiores, sobressaindo-se dentre todas as fêmeas, o grupo tratado

com nandrolona (GNF) com ligeiro aumento da média em comparação aos outros dois grupos avaliados, com significância ($p < 0,05$) (Fig. 12).

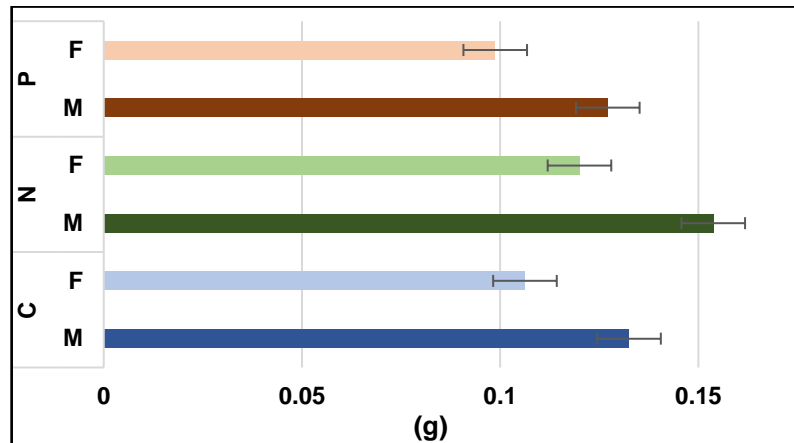


Figura 12. Média e o erro padrão do conteúdo mineral ósseo local – BMCL, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.

Na avaliação do parâmetro densidade mineral óssea local – BMDL, os machos dos grupos nandrolona e placebo obtiveram as maiores médias em comparação às fêmeas dos mesmos grupos, evidenciando ainda um discreto aumento da média dos machos do grupo nandrolona (GNM) em relação aos machos do grupo placebo (GPM) (Fig. 13).

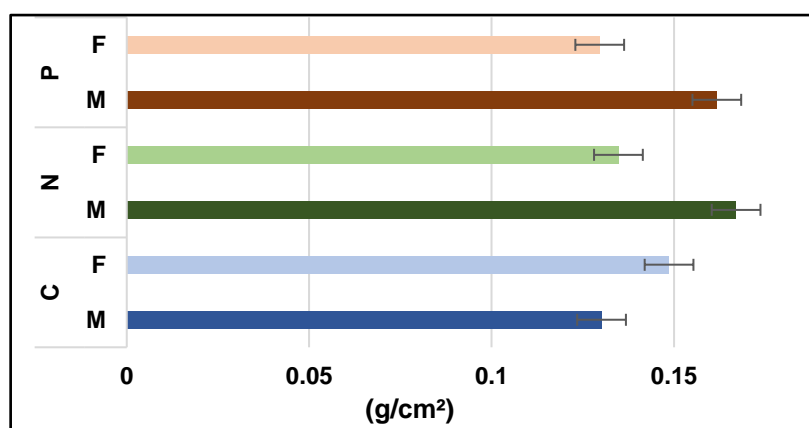


Figura 13. Média e o erro padrão da densidade mineral óssea local – BMDL, na avaliação densitométrica de qualidade da massa óssea para os grupos GCFM GCM, GNF, GNM, GPF e GPM.

O exame histopatológico foi realizado em todos os 47 animais. A avaliação histológica permitiu a identificação do defeito em processo de regeneração óssea, avaliando a macroscopia e os parâmetros de presença de tecido de granulação, osteoblastos e fibras colágenas, osso não mineralizado, formação de tecido cartilaginoso, osso lamelar maduro (ósteons), vasos sanguíneos e a formação do canal medular. Estes parâmetros seguem, em ordem cronológica, a formação do tecido ósseo propriamente dito e sua qualidade.

Os demais fatores foram também classificados em escores de 1 a 4, onde 1 = ausente, 2 = discretamente presente, 3 = moderadamente presente e 4 = presente. Foram obtidas médias dos valores obtidos em cada grupo, e os resultados expressos em gráficos.

Na macroscopia, as fêmeas do grupo controle (GCF) obtiveram médias superiores aos demais grupos, seguido dos machos do grupo nandrolona (GNM) e das fêmeas do grupo nandrolona (GNF). Os machos do grupo controle (GCM) apresentaram as menores médias (Figura 14).

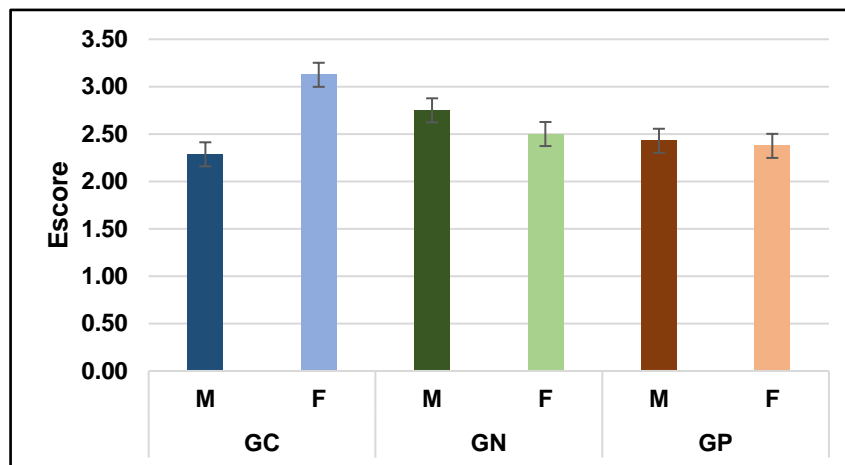


Figura 14. Média e erro padrão de macroscopia para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

No parâmetro tecido de granulação, o GCF apresentou média superior ao GNF e ao GNM, seguido do GPF (Figura 15).

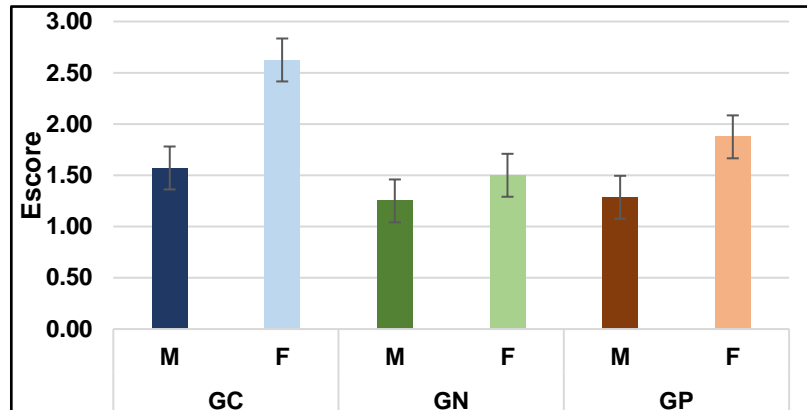


Figura 15. Média e erro padrão de tecido de granulação para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

Na avaliação do parâmetro osteoblastos e fibras colágenas, o GCF também apresentou média superior aos demais grupos, que apresentaram discretas diferenças entre si (Fig. 16)

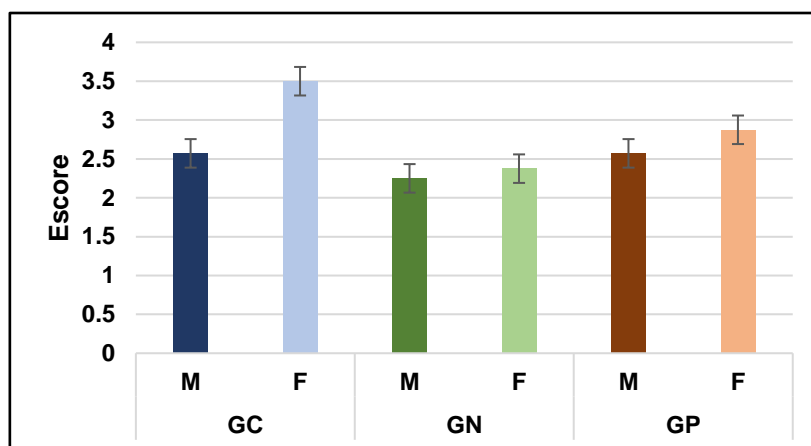


Figura 16. Média e erro padrão de osteoblastos e fibras colágenas para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

Ao parâmetro histológico osso não mineralizado, os machos do grupo placebo (GPM) obtiveram média ligeiramente superior quando comparada aos outros grupos, seguido dos machos do grupo controle (GCM). As fêmeas do grupo controle (GCF) obtiveram as menores médias (Fig. 17).

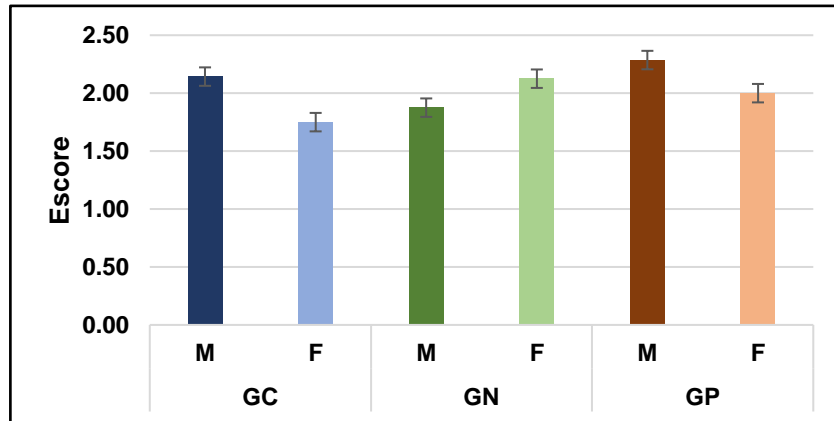


Figura 17. Média e erro padrão de tecido de osso não mineralizado para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

Analisando o parâmetro tecido cartilaginoso, nota-se uma maior média nos machos do grupo controle (GCM), seguido de uma média igual entre as fêmeas do grupo controle (GCF) e machos do grupo placebo (GPM). As menores médias foram apresentadas nos grupos GNF e GPF (Fig. 18).

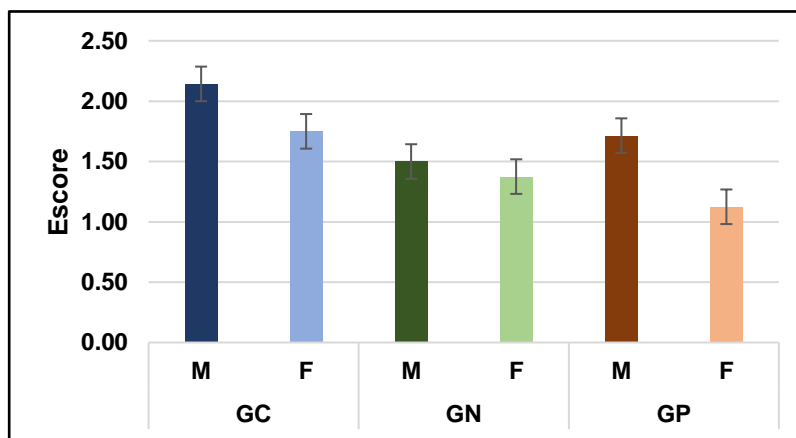


Figura 18. Média e erro padrão de tecido cartilaginoso os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

Na análise para presença de osso lamelar maduro (ósteons), as médias de todos os grupos foram semelhantes, com uma discreta diminuição na média do grupo controle das fêmeas (GCF) (Fig. 19).

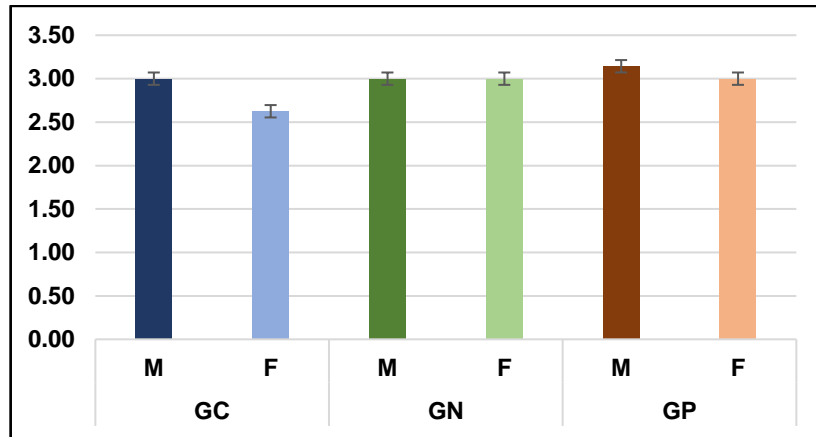


Figura 19. Média e erro padrão de osso lamelar para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

Avaliando a vascularização local (presença de vasos sanguíneos), os machos do grupo controle (GCM) e as fêmeas do grupo nandrolona (GNF) obtiveram as maiores médias. Os machos do grupo nandrolona (GNM) e as fêmeas do grupo placebo (GNP) apresentaram as menores médias em comparação aos outros grupos (Fig. 20).

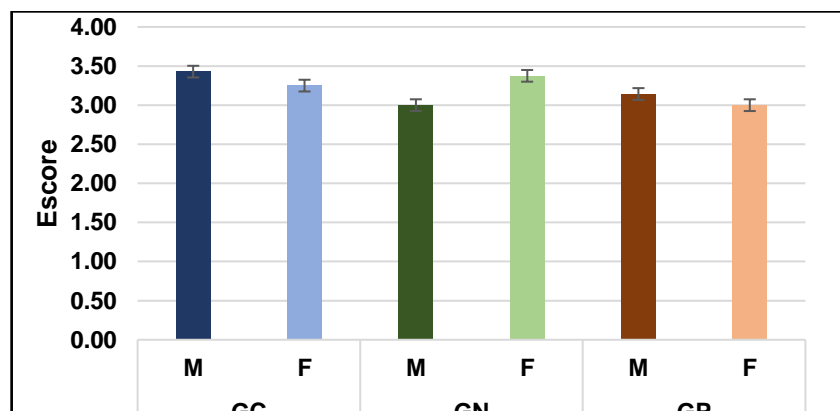


Figura 20. Média e erro padrão de vasos sanguíneos para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

Ao parâmetro que avalia a presença e qualidade do canal medular, os machos do grupo controle (GCM) apresentaram a maior média dentre os grupos. Tanto os machos quanto as fêmeas do grupo nandrolona (GNM e GNF) mostraram uma média superior quando comparado ao grupo placebo (GPM e GPF) (Fig. 21).

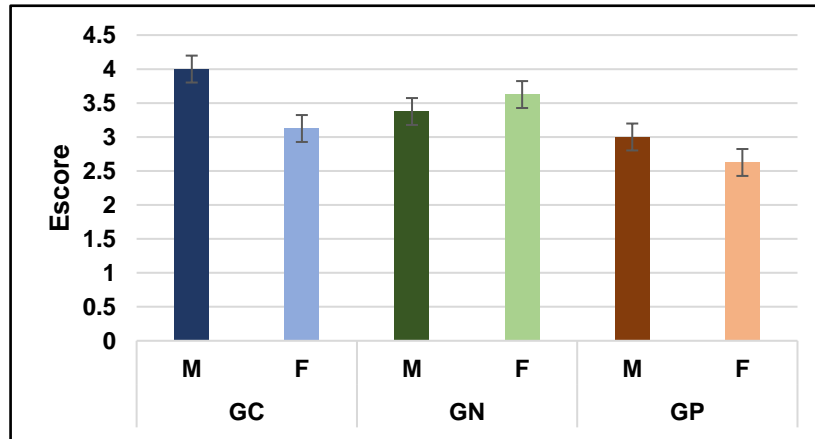


Figura 21. Média e erro padrão de canal medular para os machos e fêmeas de coelhos Nova Zelândia Branco nos grupos GC, GN e GP.

DISCUSSÃO

De maneira geral, os resultados mostram que os animais tratados com DN obtiveram eficácia superior na formação de tecido ósseo quando comparados com os demais grupos. Desta forma, corrobora a hipótese levantada de que o DN potencializa a regeneração óssea. Nos estudos anteriores utilizando o DN para aceleração da consolidação óssea, como no realizado por Abedi et al. (2012), em que foram utilizadas falhas ósseas circulares, não críticas e não afetadas por nenhuma complicação, com no máximo 4 milímetros de diâmetro, ocorreu a cicatrização total dentro da falha. Assim sendo, deve-se levar em consideração o tamanho do defeito ósseo, uma vez que no presente estudo foi possível avaliar a eficácia do fármaco e sua real ação na formação do tecido ósseo, porém tal neoformação foi insuficiente para o total preenchimento do defeito ósseo realizado, evidenciando que o fármaco se apresenta como adjuvante no tratamento de fraturas complicadas pela não união e com defeito segmentar grave.

Segundo McDermott et al. (2019), em humanos, não há formação de calo ósseo em defeitos com mais de 30mm de extensão, necessitando de intervenções cirúrgicas para que o osso tenha condições de se consolidar. Vários modelos experimentais de indução de não união óssea são apresentados na literatura. Dentre eles, usamos como base para este experimento o estudo de Hu et al. (2011), onde foram realizadas ostectomias parciais de 8mm de extensão na diáfise do fêmur em ratos, obtendo como resultado a não união óssea em 90% dos casos avaliados. Resultado semelhante foi observado no estudo de Tebyanian et al. (2018), onde

foram considerados graves os defeitos ósseos de 8mm de diâmetro na calota craniana de coelhos. Com base em tais dados, optou-se pelo tamanho da falha óssea de 10mm, visando como resultado uma não união óssea inviável por defeito segmentar, permitindo desta forma avaliar a ação do DN nestas condições. A escolha da realização da ostectomia na diáfise do rádio justifica-se pela alta incidência de união retardada e não união óssea nessa região, a qual sabe-se que ocorre por conta da baixa cobertura muscular e perda da vascularização local (Munakata et al. 2017). A localização do defeito ósseo somada a sua extensão tornou o local propício para o desenvolvimento da não união óssea, sendo presente em 100% dos casos avaliados neste estudo.

O tempo de avaliação radiográfica escolhido no presente estudo tem como base trabalhos anteriores realizados com consolidação óssea em coelhos, como o de Ahmed et al. (2013), onde aos 40 dias pós-operatório já era possível evidenciar a total cicatrização em fraturas da tíbia. Partindo deste ponto, foi escolhido o tempo de 45 dias pós-operatório para início das avaliações radiográficas, onde já era evidenciada a não união óssea, e seu fim aos 90 dias, no qual não havia mais evolução visível da neoformação óssea.

Radiograficamente, o GNM e GNF apresentaram médias superiores na formação de calo ósseo quando comparado aos outros grupos, demonstrando o potencial positivo do DN para esse fator analisado. No parâmetro que avaliou a qualidade da ponte óssea, não houve diferenças nas médias entre os grupos ao final do tratamento.

Apesar de relatos anteriores não demonstrarem diferenças significativas entre fêmeas e machos na avaliação radiográfica para cicatrização óssea para parâmetros semelhantes (Miranda et al, 2005), neste estudo foi possível notar um aumento nas médias apresentadas pelas fêmeas em relação aos machos no parâmetro que avaliou a reação periosteal, mesmo nos grupos não tratados.

Resultados semelhantes foram observados também na avaliação densitométrica local para os parâmetros BMCL e BMDL, no qual os machos apresentaram médias superiores em relação as fêmeas. Ainda a respeito das análises de densitometria óssea, ao que se refere ao BMCL, o GNM apresentou média superior em comparação aos outros grupos, com significância ($p < 0.05$). Tal resultado evidencia ação positiva do DN no aumento do conteúdo mineral ósseo do rádio nos machos tratados, entretanto, sugere-se a importância de mais estudos que avaliem as diferenças fisiológicas entre os sexos que venham a afetar a consolidação óssea nestes animais.

Na análise densitométrica geral, ao fator BMD não houve diferenças significativas entre os grupos ($p>0.05$), resultado este que corrobora o estudo de Tengstrand et al. (2007), que avaliou este parâmetro em mulheres osteoporóticas tratadas com DN, no qual da mesma forma não foram obtidos resultados significativos. Por outro lado, na análise referida ao BMC, o grupo nandrolona apresentou diferença significativa, sobressaindo-se ainda o GNF ($p<0.05$). Tal evidência concorda com os resultados obtidos por Flicker et al. (1997), onde houve um aumento significativo no conteúdo mineral ósseo em mulheres osteopênicas tratadas com DN em comparação as tratadas com placebo. Diante deste fato, é possível afirmar que o tratamento com DN aumenta o conteúdo mineral ósseo, independentemente do sexo.

Macroscopicamente, levando em consideração a taxa de união entre os fragmentos ósseos, não foi possível observar diferenças significativas nas médias entre os grupos, entretanto, o aspecto tecidual observado nos animais do GN parecia ser mais regular e organizado.

Quanto às análises histológicas, para o primeiro parâmetro avaliado “tecido de granulação” o grupo controle apresentou as maiores médias, com destaque ao GCF. Aqui, devemos ressaltar que os animais do GC foram submetidos à eutanásia aos 45 dias, diferentemente dos outros grupos. Desta maneira, é necessário expor que por conta da diferença no tempo de avaliação em cada grupo, o processo de reparação óssea encontrava-se em diferentes fases, sendo a formação do tecido de granulação uma das primeiras delas (Zamarian, 2014). Assim, justifica-se os dados expostos neste estudo.

Os achados de Senos (2014) indicam que mesmo quando o osso é acometido pela não união óssea, ainda há evidências de atividade osteoblástica e osteoclástica, mesmo sem algum tratamento. Entretanto, os ratos tratados com DN apresentaram maior ação de osteoblastos, diferindo do presente estudo, pois foi possível observar que os grupos GNF e GNM apresentaram as menores médias quanto à ação dos osteoblastos e fibras colágenas, e o grupo controle evidenciou as maiores médias. Isso pode ser justificado por outro dado obtido por Senos (2014), ao qual se nota que o DN acelera o processo de formação de osso maduro, lembrando que no presente estudo os grupos GCF e GCM foram avaliados anteriormente aos demais grupos. Ao parâmetro “osso não mineralizado”, não foram obtidas diferenças significativas entre os grupos, porém o único grupo em que os machos apresentaram média inferior foi entre os animais tratados com DN. Já na comparação entre fêmeas, o GNF obteve

uma média superior, confirmando que o fármaco tenha potencial para equiparar a diferença da massa óssea evidenciada entre machos e fêmeas (Vanderschueren et al., 2004; Senos, 2014).

Os machos de todos os grupos apresentaram médias superiores quando comparados às fêmeas no quesito de presença de tecido cartilaginoso, evidenciando ainda a maior média obtida pelo GCM. Estes resultados podem ser considerados semelhantes aos obtidos por Hu (2011). Neste estudo, foram avaliados ratos com não uniões ósseas e evidenciada a presença de tecido cartilaginoso até a 7^a semana (aproximadamente 50 dias), diminuindo progressivamente na 10^a e 12^o semanas (70 e 85 dias aproximadamente). Hu (2011) ressalta ainda que a presença de tecido cartilaginoso indica formação óssea endocondral ativa. Complementando as evidências obtidas no presente estudo, Vanderschueren et al. (2004) ressaltam que ratos machos apresentam maior formação de osso cortical em relação as fêmeas, causada pela ação dos andrógenos; já o estrogênio parece diminuir a formação óssea periosteal. O mesmo estudo traz dados comprobatórios de que homens afetados por tumores gonadais e orquiectomizados evidenciaram um aumento de 50% no risco de fraturas patológicas decorrentes de osteopenia quando comparados aos que não foram submetidos ao procedimento. Também cita que homens orquiectomizados que realizaram terapia androgênica não obtiveram queda na BMD ao exame de densitometria óssea quando comparado aos homens não tratados.

Comparando os grupos tratados (GN e GP), independentemente do sexo, o GN sempre apresentou menor média em todos os parâmetros histológicos avaliados. Entretanto, em referência ao parâmetro que marca a última etapa da neoformação óssea pela presença de osso lamelar, ambos os grupos apresentaram resultados quase idênticos. Diante deste fato, é possível presumir que o DN possa ter encurtado as fases anteriores a esta, concordando com Zamarian (2014).

Referindo à quantidade de vasos sanguíneos presentes no corte histológico, um fato curioso é evidenciado dentro do GN: as fêmeas apresentaram médias superiores somente neste grupo. Este dado pode ser comparado com os dados obtidos no estudo realizado por Lam et al. (2019), o qual traz que os andrógenos induzem a vasculogênese em ratas castradas submetidas a isquemia vascular em membro pélvico. Partindo do pressuposto que o DN é um andrógeno, pode-se suspeitar que o mesmo possui propriedades vasculogênicas. Este fato também pode ter influência nas análises realizadas para avaliar a qualidade do canal medular, onde de mesmo modo nota-se uma média superior no grupo tratado com DN, sobressaindo-se mais uma vez o GNF. Uma vez que a vascularização local tem relação direta com a qualidade do canal medular,

os resultados vistos neste estudo concordam com Senos (2014), que é capaz de evidenciar em seu estudo a presença de um canal medular de melhor qualidade nos animais tratados com DN.

Embora a literatura traga que o DN apresenta menor toxicidade e baixa taxa de efeitos adversos quando comparado à testosterona, trabalhos evidenciam que superdosagem do andrógeno associada a tratamentos por longos períodos está relacionada a alterações no sistema cardiovascular, aumento da agressividade em machos e potencial nefrotóxico e hepatotóxico (Melloni et al., 1997; Pozzi et al., 2013; Tsitsimpikou et al., 2016; Jerônimo et al., 2019). Não foram analisados os efeitos colaterais do DN no presente estudo, entretanto os animais mantiveram-se aparentemente saudáveis durante todo o tempo em que foram avaliados, isso provavelmente é justificado pela escolha da dose utilizada e curto período de tratamento realizado.

CONCLUSÃO

A partir das evidências do presente estudo, foi possível concluir que o decanoato de nandrolona possui propriedades osteogênicas apresentando interferência positiva na neoformação óssea, aumentando também o conteúdo mineral ósseo (BMC) local e geral, entretanto, ainda se torna indispensável a combinação desta terapia com o tratamento cirúrgico para não união óssea. Nas avaliações histológicas, a ordem cronológica da formação do tecido ósseo deve ser levada em consideração na interpretação dos resultados. Conclui-se ainda que os machos apresentam naturalmente características fisiológicas que alteram positivamente o ganho de massa óssea, sugerindo assim novos estudos em que haja comparação entre os sexos e uso de esteroides.

REFERÊNCIAS

- ABEDI, G.; ALIZADEH, R.; ASGHARI, A.; SEDGHANI, P. (2012). Radiographic evaluation of androgen on tibial bone defect healing in rabbit. **European Journal of Experimental Biology**. 2(4):1315-1319.
- AHMAD, F.; YUNUS, S. M.; ASGHAR, A.; FARUQI, N. A. (2013) Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits—a study on experimental model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**. 7(1):93.
- AI-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; *et al.* (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of dental research**. 87(2):107-118.
- AN, Y. H. (1999). Animal models of bone fracture or osteotomy. **Animal models in orthopaedic research**. 205-208.
- BERNER, A.; REICHERT, J. C.; MÜLLER, M. B.; *et al.* (2012) Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. **Cell and tissue research**. 347(3):501-519.
- BROWNLOW, H. C.; REED, A.; SIMPSON, A. H. R (2002) The vascularity of atrophic non-unions. **Injury**. 33(2): 145-150 p.
- CAVALARI, F. C. (2011) **Ação de andrógenos e catequina sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos Wistar imaturos**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- COLLIGNON, A. M.; LESIEUR, J.; VACHER, C.; *et al.* (2017) Strategies developed to induce, direct, and potentiate bone healing. **Frontiers in physiology**. 8:927.
- COUTO, S. E. R. (2002) Criação e manejo de Coelhos. In: _____ **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 388 p.
- DINOPOULOS, H.; GIANNOUDIS, P. V. (2007) The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. **Current orthopaedics**. 21(4):268-279.

FLICKER, L. *et al.* (1997) Nandrolone decanoate and intranasal calcitonin as therapy in established osteoporosis. **Osteoporosis International**, 7:29-35

HU, C. T. *et al.* (2011) Nandrolone decanoate and intranasal calcitonin as therapy in established osteoporosis. **J Orthop Trauma**, 25(8).

JANICKI, P.; SCHMIDMAIER, G. (2011) What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. **Injury**. 42: S77-S81.

JERÔNIMO, L. C. *et al.* (2019) Effects of supraphysiological doses of anabolic androgenic steroids on the left ventricles of male and female mice submitted to swimming. **Journal of Morphological Sciences**, 36(1):2–6.

JOHNSON, A. L. (2014) **Cirurgia de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier. 823-899 p.

JOHNSON, A. L.; HOULTON, J. E.; VANNINI, R. (2005) The principles of fracture management in the dog and cat. Suíça: **AO Publishing**. 72-97 p.

KNIGHT, M. N.; HANKENSON, K. D. (2013) Mesenchymal stem cells in bone regeneration. **Advances in wound care**. 2(6):306-316.

KRAUSS, K. H.; BAYER, B. J. (2012) **Veterinary surgery small animal**. Elsevier. 1961-1983 p.

LAM, Y. T. *et al.* (2019) Androgens ameliorate impaired ischemia-induced neovascularization due to aging in male mice. **Endocrinology**, 160(5): 1137-1149.

LI, X. *et al.* (2000) The effects of nandrolone decanoate on bone mass and metabolism in ovariectomized rats with osteopenia. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, 18:258–263.

MARQUES, D. R. C. (2016) **Interferência do Deca-Durabolin na consolidação óssea em osteotomia para o avanço da tuberosidade da tíbia**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MASSIE, A. M.; KAPATKIN, A. S.; FULLER, M. C.; VERSTRAETE, F. J.; *et al.* (2017) Outcome of nonunion fractures in dogs treated with fixation, compression resistant matrix, and

recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**. 30(02): 153-159.

MCDERMOTT, A. M. *et al.* (2019) Recapitulating bone development through engineered mesenchymal condensations and mechanical cues for tissue regeneration. **Science Translational Medicine**. 11, eaav7756.

MELLONI, R. H. *et al.* (1997) Anabolic-androgenic steroid exposure during adolescence and aggressive behavior in golden hamsters. **Physiology & Behavior**, 61(3): 359-364.

MIRANDA, E. S. *et al.* (2005) Organic and inorganic bone graft use in rabbit's radius surgical fractures repair: an experimental and comparative study. **Acta Ortop Bras**, 13(5).

MUNAKATA, S.; NAGAIHIRO, Y.; KATORI, D.; *et al.* (2018). Clinical Efficacy of Bone Reconstruction Surgery with Frozen Cortical Bone Allografts for Nonunion of Radial and Ulnar Fractures in Toy Breed Dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**. 31(03):159-169.

ÖZTÜRK, A.; ILMAN, A. A.; SAGLAM, H.; *et al.* (2008) The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**. 14(1): 21-27.

PERREN, S. M. (2002) Evolution of the internal fixation of long bone fractures: the scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. **The Journal of bone and joint surgery**. British volume, 84(8): 1093-1110.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L.; BRINKER, W. O. (2009) **Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais**. São Paulo: Manole. 4 p.

POZZI, R. *et al.* (2013) Nandrolone Decanoate Induces Genetic Damage in Multiple Organs of Rats. **Arch Environ Contam Toxicol**, 65:514-518.

ROVESTI, G. L. (2005) Principles of fracture management in the dog and cat. Suíça: **AO Publishing**. 394-409 p.

SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. L.; DE QUEIRÓZ, G. F.; *et al.* (2003) Tratamento cirúrgico de união retardada e não-união de fraturas em cães: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 6(1/3): 74-82.

SENOS, R. (2014). **Uso do decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos**. 89 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

TAN, H. B.; GIANNOUDIS, P. V.; BOXALL, S. A.; *et al.* (2015) The systemic influence of platelet-derived growth factors on bone marrow mesenchymal stem cells in fracture patients. **BMC medicine** 13(1): 6.

TEBYANIAN, H. *et al.* (2018) Effects of collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, 00(0).

TENGSTRAND, B. *et al.* (2007) Effects of protein-rich supplementation and nandrolone on bone tissue after a hip fracture. **Clinical Nutrition**, 26:460-465.

TSAI, K. L. (2017) Case report: three cases of non-union fracture in dogs treated with adipose-derived adult stem cells combined with autologous cancellous bone and synthetic bone substitutes. **Taiwan Veterinary Journal** 43(01): 1-9.

TSITSIMPIKOU, C. *et al.* (2016) Nephrotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. **Toxicology Letters**, 259: 21-27.

TUDURY, E. A.; SOUZA, A. F.; FERNANDES, T. T.; *et al.* (2017) Desenvolvimento e avaliação de equipamento de tração, para redução de fraturas de ossos longos de cães. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia** 69(4): 933-940.

VANDERSCHUEREN, D. *et al.* (2004) Androgens and bone. **Endocrine Reviews** 25(3):389–425.

VIEIRA, R. P.; FRANÇA, R. F.; DAMACENO-RODRIGUES, N. R.; *et al.* (2008) Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. **Medicine and Science in Sports and Exercise** 40(5): 842.

VO, T. N.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. (2012) Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. **Advanced drug delivery reviews** 64(12): 1292-1309.

YUN, S. *et al.* (2005) Effect of nandrolone decanoate on disuse muscle atrophy and bone healing in dogs. **J Vet Clin**, 22(4): 336-341.

ZAMARIAN, T. P. (2014) **Avaliação histológica do processo de reparo em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos tratados com decanoato de nandrolona**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná, Palotina.