RAFAEL SENOS

Uso do decanoato de nandrolona na nãounião de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos

> São Paulo 2014

RAFAEL SENOS

Uso do decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em fêmur de rato:

aspectos morfológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3060 FMVZ Senos, Rafael

Uso do decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos / Rafael Senos. -- 2014.

88 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Atrófica. 2. Colágeno. 3. Morfometria. 4. Pseudoartrose. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso de decanoato de nandrolona na nãounião de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos", protocolado sob o nº 2904/2013, utilizando 10 (dez) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "The nandrolone decanoate use in experimental nonunion fracture of the femur of the rat: morphological aspects", protocol number 2904/2013, utilizing 10 (ten) rats, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 30 de outubro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni Presidente





Sarriço Público Fistaral Universidada Fistaral Fluminanca Pro-Raitoria da Pasquis a Pos-Graduação a Ino vação Comitá da Ética no Uso da Animais

Certificamos que o projeto nº 170, intitulado "ESTUDO DO PERFIL MORFOLÓGICO DE FRATURAS ATRÓFICAS EM OSSOS LONGOS DE RATOS (Rattus novergicus) TRATADAS COM DECANOATO DE NANDROLONA" sob a orientação do Prof. Dr. Mauro Roberto Rodrigues do Instituto Biomédico está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em 12 de abril de 2012.

Niterói, 12 de abril de 2012.

Presidente da C.E.U.A.

Jabie Otero Axel

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SENOS, R.

Título: Uso do decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em

fêmur de rato: aspectos morfológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:	/	' /	/

Banca Examinadora

Prof. Dr		
	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	lulgamento:	

DEDICATÓRIA

À memória daqueles que continuam me inspirando, ao meu avô Augusto de Oliveira Senos, a amiga Professora Ana Graça "Nana", ao amigo Professor Mestre André Soares e meu companheiro Shelby Von der Stockhausen.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Anamaria Szrajbman Vaz da Silva pelo carinho, paciência, amizade, companheirismo e ajuda nos momentos fáceis e difíceis.

À minha família por todo apoio neste período de intensa atividade, meus pais João Carlos Lossano dos Santos e Denise Senos dos Santos, meus irmãos Filipe Senos dos Santos e Amanda Senos dos Santos, minha avó Yolanda Pereira Senos, meus tios Evandro Queiroz Gomes e Daise Pereira Senos, primos Bruno e Bruna Senos Queiroz Gomes e Francys Rangel Senos e meus sobrinhos Pedro Rangel Senos Queiroz, João Rangel Senos Queiroz, Marina Pereira dos Santos Silva e Lucas Benavide Costa.

Ao Professor Dr. Pedro Primo Bombonato, meu primeiro orientador desta tese, pela confiança, amizade e oportunidade.

Ao Professor Dr José Roberto Kfoury Júnior, meu orientador do presente estudo, pelo companheirismo, compreensão e ajuda.

Ao Professor e amigo Dr. Mauro Roberto Rodrigues pela amizade, parceria, grandiosa colaboração e incentivo de tantos anos.

Aos Professores Maria Angélica Guzmán Silva, Inayá Lima, Rose Eli Rici, Francisco Blazquez e a Dra Hazel Hathaway pelo carinho e apoio técnico.

Às alunas e amigas Louise Viana, Thaís Maria Santos e Alessandra Silveira por suas colaborações na execução desse trabalho.

Ao Professor Rodrigo Mota Pacheco por ajudar no desenvolvimento do modelo experimental,

À banca examinadora por participar deste momento especial e conferir a honra de sua avaliação.

Aos colegas de pós-graduação sempre amigáveis, bem-humorados e dispostos a ajudar, Fernanda Rodrigues Agreste, Camila Ercolini Barroso, Rafael Agopian, Juliana Ferrão, Renata Fontenelle e Yuri Karacas.

Ao meu primo Carlos Eduardo Senos Dantas e aos amigos Flávia Moreno, Carlos Sarmento, Valdir Pavanello Júnior e Renata Martins por me acolherem em seus lares cordialmente e viabilizando meus estudos em diversos momentos.

Aos técnicos Diogo Palermo e Ronaldo Agostinho pelo suporte durante os procedimentos técnicos laboratoriais.

Aos funcionários da USP sempre dispostos a ajudar, em nome de Jaqueline de Santana.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres Professora Dra. Maria Angélica Miglino pela confiança e apoio.

Aos professores do Departamento de Morfologia da Universidade Federal Fluminense pelo grande incentivo nesta jornada acadêmica, em nome de Dr. Jurandyr de Abreu Câmara Filho, Dr Renato Luiz da Silveira, Mestre Marco Aurélio Ramos dos Santos Barbosa e Dra Viviane Alexandre Nunes Degani.

Aos meus amigos, em nome de Flávia Moreno, Alexandre dos Santos da Silva, Taís Silva Pereira, Eduardo França, Veronica Benavide e Raphael Francisco Dutra Barbosa da Rocha pelo incentivo.

A todos os professores que dedicaram tempo a minha formação nas pessoas de Leila Gatti Sobreiro, Ismar Araújo de Moraes, Pedro Ramires, Robson Franco, Wilbert Fernando, Isabel Vitória, Teófilo Pimentel, Newton Rocha e Sônia Souza e Fernando Soares.

Ao grande mestre de arte e vida Jociglei Cadena e Ivanilda por seus ensinamentos, incentivo, carinho e amizade.

Aos meus alunos, ex-alunos e orientados representados no nome de Fellipe Tolezano, por inspirarem essa aventura acadêmica.

"Pesquisa é colaboração; é parceria." Maria Angélica Miglino, 2012

RESUMO

SENOS, R. Uso do decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos. [The use of nandrolone decanoate in experimental nonunion fracture of the femur of the rat: morphological aspects]. 2014. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A não-união de fratura é uma complicação relativamente comum em ortopedia humana e veterinária. Dentre os tipos de não-união, a atrófica costuma ser a mais difícil de tratar. Atualmente, o tratamento amplamente utilizado para esses casos é invasivo. Buscando alternativas, o presente estudo objetivou observar se o decanoato de nandrolona interfere positivamente no incremento de regeneração de não-união de fratura óssea com déficit vascular induzida experimentalmente em rato. Foram utilizados 10 ratos adultos da linhagem Wistar (Rattus norvegicus), divididos em 2 grupos (grupo controle - GC e grupo tratado - GNan). Protocolos cirúrgicos foram desenvolvidos a fim de promover fratura na diáfise do fêmur esquerdo com indução de déficit vascular por remoção do periósteo e endósteo e isolamento do foco de fratura com artefato de látex. Em seguida ao estabelecimento do quadro de não-união de fratura nos dois grupos de estudo, foi administrado 1,5mg/kg de decanoato de nandrolona IM, uma vez por semana, durante 4 semanas no GNan. A verificação do perfil morfológico do tratamento foi realizada pelo exames radiológicos periódicos, exame anatomopatológico, microscopia eletrônica de varredura, microtomografia computadorizada e microscopia óptica. Os resultados mostraram que o protocolo de não-união de fratura desenvolvido foi eficiente para estudos qualitativos e quantitativos de crescimento ósseo. Adicionalmente, foi observado que o decanoato de nandrolona promoveu incremento significativo de regeneração óssea em não-união de fratura com déficit vascular por aumento da atividade osteoblástica e redução da atividade osteoclástica no GNan. Houve aumento de massa óssea na cabeça femoral e diferentes regiões da diáfise femoral. As análises de percentual de colágeno não revelaram diferenças significativas entre GC e GNan, portanto, a qualidade óssea entre os grupos é semelhante. Dada viabilidade econômica do fármaco, é sugerido ensaios mais avançados que comprovem o potencial terapêutico do decanoato de nandrolona no tratamento de não-união de fratura atrófica em pacientes humanos e veterinários.

Palavras-chave: Atrófica. Colágeno. Morfometria. Pseudoartrose.

ABSTRACT

SENOS, R. The use of nandrolone decanoate in experimental nonunion fracture of the femur of the rat: morphological aspects. [Uso do decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos]. 2014. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The nonunion fracture is a relatively frequent complication in both human and veterinary medicine. Among their types, the atrophic nonunion fracture is usually the most difficult to treat and the elective treatment is surgery. In order to search for alternative therapeutic approach, the present study aimed to analyze the morphological changes induced by the use of nandrolone decanoate in experimental nonunion fracture with vascular deficit in the rat model. Ten adult Wistar rats (Rattus norvegicus) were divided into two groups, control (GC) and nandrolone decanoate (GNan). Surgical protocols were developed to promote fracture nonunion in the left femur diaphysis with vascular deficit by removing the periosteum and endosteum and isolating the fracture site using a latex artifact. After the establishment of the nonunion fracture, the GNan was treated with nandrolone decanoate (1.5mg/kg IM, once a week, during 4 weeks). Periodical radiological examinations were performed. addition, anatomopathological evaluation, scanning electron microscopy, computed micro-tomography and optical microscopy techniques were performed. The results showed that the surgical protocols to establish the nonunion fracture were efficient and allowed qualitative and quantitative evaluation of bone growth. Besides, the nandrolone decanoate promoted the bone regeneration at the nonunion fracture site by raising the osteblastic activity and reducing the osteclastic activity. The percentage of collagen analysis did not reveal significant differences between GC and GNan. This guarantees some quality for the regenerated bone. Due to the economical viability of the use of nandrolone decanoate use, new advanced studies are recommended to prove the therapeutic potential of that anabolic steroid for the treatment of atrophic nonunion fracture in humans and other animals.

Keywords: Atrophic. Collagen. Morphometry. Pseudoarthrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura externa e interna de osso longo	22
Figura 2 -	Estrutura microscópica do osso compacto	23
Figura 3 -	Esquema de consolidação secundária de fratura em osso longo e acompanhamento radiográfico	26
Figura 4 -	Radiografias de não-uniões fratuárias femorais com esclerose das bordas fratuárias	27
Figura 5 -	Modelos experimentais de não-união de fratura óssea encontrados na literatura que utilizam diferentes técnicas	30
Figura 6 -	Representação gráfica da molécula de nandrolona (A) e formulação comercial do decanoato de nandrolona (B)	31
Figura 7 -	Cronograma das etapas metodológicas <i>in vivo</i> do estudo	36

Figura 8 -	Sequência de técnica cirúrgica para instalação de quadro de não-unão de fratura no fêmur esquerdo de rato	38
Figura 9 -	Esquema de técnica cirúrgica de implantação do pino intramedular em fêmur de rato	39
Figura 10 -	Técnica cirúrgica de remoção do artefato isolante de látex de fêmur de rato e constatação de não-união de fratura	40
Figura 11 -	Fragmentos ósseos coletados do grupo tratado com decanoato de nandrolona (GNan) e do grupo controle (GC) para processamento histológico	42
Figura 12 -	XCT realizada no LIN-UFRJ	43
Figura 13 -	Planos de secção transversal utilizados na quantificação estereológica e/ou bidimensional para osso cortical e trabeculado no fêmur esquerdo dos ratos estudados	44
Figura 14 -	Esquema de planos de clivagem dos segmentos proximal e distal e áreas de osso cortical analisadas em fêmur esquerdo de rato na microscopia óptica	45
Figura 15 -	Imagem radiográfica de membro pélvico esquerdo do rato número 2 (Rattus norvegicus), posição medial-lateral	48

Figura 16 -	Imagens radiográficas de membros pélvicos esquerdos de ratos. Posição latero- lateral	49
Figura 17 -	Imagens radiográficas dos membros pélvicos dos ratos do grupo controle e do grupo tratado com decanoato de nandrolona 125 dias após osteotomia	50
Figura 18 -	Fragmentos distais de fêmur esquerdo de ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>), vista proximal	51
Figura 19 -	Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos ósseos de fêmures de ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	53
Figura 20 -	Fotomicrografia da borda da fratura do fragmento proximal do grupo controle em quadro de não-união de fratura em fêmur esquerdo de rato	53
Figura 21 -	Imagens radiológicas de microtomografia computadorizada de fêmures esquerdos de ratos em quadro de não-união de fratura. Vista cranial. Análises externas e internas de secção coronal dos segmentos proximal e distal	54
Figura 22 -	Aspectos morfológicos dos fêmures esquerdos de ratos analisados em microtomografia computadorizada	55

Figura 23 - Fotomicrografias histológicas de tecido ósseo próximas a borda de fratura fêmures esquerdos não-unidos de ratos do grupo controle (A e C) e do grutatado com decanoato de nandrolona (B e D)		
Figura 24 -	Fotomicrografias histológicas de tecido ósseo coradas com Picrossírius modificado para evidenciação das fibras colágenas na cor vermelha	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	ratos realizadas em microtomografia computadorizada	56
Tabela 2 -	Análises morfométricas bidimensionais e tridimensionais de osso cortical das diáfises femorais dos segmentos proximal e distal em fêmures de ratos realizada em microtomografia computadorizada	57

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Valores nutricionais da ração utilizada para alimentação dos ratos.	82
APÊNDICE B -	Protocolo de técnica colorimétrica para caracterização de tecido ósseo, Hematoxilina-eosina.	83
APÊNDICE C -	Protocolo de técnica colorimétrica para evidenciação de fibras colágenas, Picrosírius modificado.	84
APÊNDICE D -	Tabela com valores absolutos das análises de microtomografia computadorizada de osso trabecular do terço médio da cabeça femoral de ratos no grupo controle e tratado com decanoato de nandrolona. Valores por espécime.	85
APÊNDICE E -	Tabela com valores absolutos das análises de microtomografia computadorizada de osso cortical do segmento proximal a aproximadamente 3mm proximal do foco não-união de fratura em fêmures de ratos nos grupos controle e tratado com decanoato de nandrolona. Valores por espécime.	86
APÊNDICE F -	Tabela com valores absolutos das análises de microtomografia computadorizada de osso cortical do segmento distal a aproximadamente 3mm distal do foco não-união de fratura em fêmures de ratos dos grupos controle e tratado com decanoato de nandrolona. Valores por espécime.	87

Tabela com valores absolutos das análises de percentual de colágeno

APÊNDICE G - próximo as bordas de fraturas de fêmures não-unidos de ratos em cada um dos cinco campos analisados por espécime numerado (#).

88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	CARACTERÍSTICAS DO OSSO	21
1.2	AS FRATURA ÓSSEAS	24
1.3	NÃO-UNIÃO DE FRATURA	26
1.4	OS MODELOS EXPERIMENTAIS ATUAIS DE NÃO-UNIÃO DE FRATURA	29
1.5	O DECANOATO DE NANDROLONA	30
1.6	OBJETIVO	32
1.7	JUSTIFICATIVA	32
2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1	COMITÊ DE ÉTICA	35
2.2	ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO	35
2.3	ETAPAS EXPERIMENTAIS	35
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
3	RESULTADOS	48
3.1	EXAMES RADIOGRÁFICOS	48
3.2	ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS	51
3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	52
3.4	MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA	54
3.5	MICROSCOPIA ÓPTICA	58
4	DISCUSSÃO	62
4.1	O MODELO EXPERIMENTAL	62
4.2	SOBRE O USO DO DECANOATO DE NANDROLONA	64
5	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS DOS OSSOS

Os ossos funcionam como uma armação do corpo, protegendo algumas vísceras, e como alavancas para os músculos, possibilitando os movimentos. São considerados, ainda, órgãos hematopoiéticos por conterem a medula óssea, fonte de eritrócitos e leucócitos. Além destas características, constituem reserva mineral, especialmente, de cálcio e fósforo (CALHOUN, 1954; MCLEAN, 1958).

Os ossos longos são assim chamados por possuírem uma dimensão maior que outras duas dimensões. Tipicamente, são cilíndricos, alongados e possuem extremidades alargadas. São comumente encontrados nos membros onde atuam como alavancas de suporte para os movimentos. É dividido em três segmentos característicos, uma parte central conhecida por diáfise ou corpo que possui formato tubular e outras duas extremidades de morfologia irregular, conhecidas com epífises. Fêmur dos mamíferos, incluindo o homem, cão e rato, é um osso longo (GETTY, 1986; DYCE; SACK; WENSING, 2010).

As epífises dos ossos longos revelam uma camada externa chamada de substância compacta. Internamente, encontramos o osso trabecular mais frouxamente arranjado. Em ossos longos, a diáfise está escavada para formar a cavidade medular e, portanto, encontramos apenas a substância compacta conhecida por osso cortical (CAMPBELL, 1968; GETTY, 1986; DYCE; SACK; WENSING, 2010).

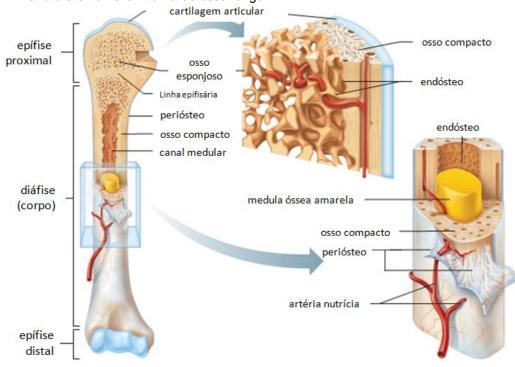


Figura 1 - Estrutura externa e interna de osso longo

Fonte: (http://antranik.org/cartilage-and-bones/, 2013, adaptado por SENOS, 2014).

Uniformemente espalhadas pelo tecido ósseo, encontramos as células ósseas ou osteócitos. Esta célula representa a diferenciação terminal do seu precursor osteoblasto que ocorre após a mineralização de toda a matriz extracelular ao seu redor (WEBSTER et al., 2013). Um último tipo celular, chamado de osteoclasto, encontra-se no tecido ósseo com função de reabsorver o tecido ósseo e, assim, modelar e remodelar o osso (EURELL, 2004).

Do ponto de vista estrutural, o tecido ósseo possui uma matéria orgânica (2/3 do peso do osso) e uma matéria inorgânica (1/3 do peso do osso). A matéria orgânica é responsável pela flexibilidade e elasticidade do osso. Além das células, ela possui uma grande quantidade de colágeno. Por outro lado, a dureza do osso é conferida pelos seus compostos inorgânicos do qual destaca-se o fosfato de cálcio (GETTY, 1986).

A deposição de sais de cálcio na substância intersticial do osso reduz sua permeabilidade. Desta forma, para a ideal vascularização, os ossos possuem canais vasculares, que no osso compacto são orientados em relação a estrutura lamelar do osso circundante. Os canais longitudinais no centro dos osteônios são chamados de canais nutrícios. Eles contêm vasos sanguíneos que se comunicam entre si, com o endósteo da cavidade medular e com o periósteo superfície óssea (HUGHES, 1952; MCLEAN, 1958).

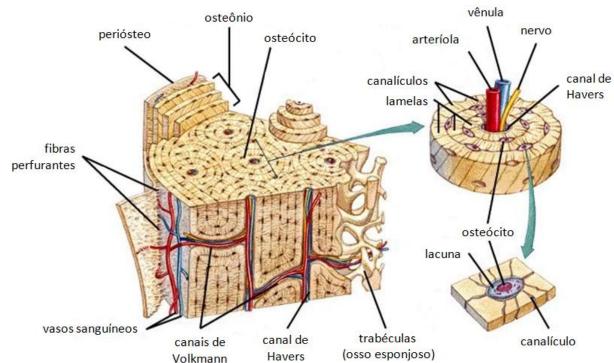


Figura 2 - Estrutura microscópica do osso compacto

Fonte:

(http://s199.photobucket.com/user/susan_dalisay2000/media/Human%20Anatomy/33e9.jpg.html 2013; adaptado por SENOS, 2013).

O periósteo é a membrana delgada de tecido conjuntivo especializado e de grande potencial osteogênico que reveste o osso. O endósteo, a exemplo do periósteo, tem grande potencial de formação óssea, contudo é uma membrana que reveste a cavidade medular (EURELL, 2004).

Os ossos são estruturas muito dinâmicas em constante renovação pelas atividades osteoblásticas e osteoclásticas. Tornam-se mais delgados e fracos pelo desuso e hipertrofiam-se para suportar maiores cargas (DYCE; SACK; WENSING, 2010). Suas estruturas resistem à compressão de 1,2kg/cm² e tensão média é de 914,4kg/cm² (MCLEAN, 1958). Em ocasiões nas quais forças externas superam as resistências, os ossos fraturam. Em resposta, um reparo pode ocorrer formando regenerado (SALTER, 2001; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).

1.2 AS FRATURAS ÓSSEAS

A lesão óssea mais comum é a fratura que pode ser descrita como uma descontinuidade do tecido ósseo. Essa descontinuidade resulta de forças de compressão, tensão ou avulsão que superam a resistência do tecido (SALTER, 2001; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002).

As forças intensas o suficiente para fraturar um osso, comumente, lesionam também os tecidos moles adjacentes. Nessas situações, frequentemente, nos deparamos com quadros de necrose muscular extensa, hemorragia provocada por cisalhamento dos vasos sanguíneos, lacerações de inserções tendíneas ou fixação de ligamentos ou, ainda, lesões nervosas provocadas por estiramento, esgarçamento ou ruptura (HUTH, 1989; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; HULSE; JOHNSON, 2002; DENNY; BUTTERWORTH, 2006; ZALAVRAS et al., 2008).

O processo de reparo da fratura é definido por possuir três fases distintas. Na fase inflamatória, iniciada horas após a instauração do quadro fratuário, existe uma extensa laceração do periósteo. A ruptura resultante de vasos sanguíneos no periósteo e tecidos moles adjacentes ocasiona hemorragia extensa. Em adição, músculos e outros tecidos moles podem sofrer necrose e hemorragia. Encontramos, ainda, necrose do tecido ósseo no foco fratuário pela interrupção do suprimento sanguíneo no osso. Essas características são evidenciadas pela ausência de osteócitos e lacunas ósseas vazias (HULSE; JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

Poucos dias após a fratura, a hemorragia forma um coágulo grande que precisa ser reabsorvido para que a fratura possa progredir no seu processo de consolidação. A neovascularização inicia-se na periferia do coágulo formado e pode estender-se até os tecidos moles vizinhos ou cavidade medular. São evidenciados, também, dilatação dos vasos sanguíneos adjacentes, transudação, exsudação e resposta inflamatória padrão de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células mononucleares. Por volta do sétimo dia de fratura, grande parte do coágulo é organizada pela invasão de vasos sanguíneos e fibrose inicial (HULSE; JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

Nesta mesma época, encontra-se osso inicial, trançado, correspondente a cicatriz óssea. Uma vez que a neoformação óssea necessita de suprimento sanguíneo adequado, os pequenos fragmentos de osso inicial são formados na periferia do coágulo, onde a vascularidade é maior. Os osteoblastos, responsáveis pelo osso inicial, são originados de células mesenquimatosas pluripotentes dos tecidos moles e medula óssea (HULSE;

JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

Na maioria das fraturas observa-se, também, a formação de cartilagem que, por fim, é reabsorvida por ossificação endocondral. Esse tecido misto de osso e cartilagem é chamado por calo ósseo (HULSE; JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

A fase seguinte, de reparação, inicia-se na primeira semana após a fratura e estende-se por meses dependendo do grau de liberdade de movimento do foco fratuário. Durante esta fase não são mais encontradas células inflamatórias agudas. A etapa é caracterizada pela diferenciação de células pluripotentes em fibroblastos e osteoblastos. A reparação ocorre da periferia para o centro do foco de fratura com objetivo de organizar e absorver o coágulo sanguíneo e, ainda, prover neovascularização para a construção do calo que irá consolidar o osso ao final desta fase de reparo (HULSE; JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

Durante esta fase, grandes quantidades de osteoclastos dentro dos canais de Havers e Volkmann atuam a fim liberar novo aporte sanguíneo. O crescimento do calo ósseo externo é contínuo e se forma calo no endósteo, interno, na cavidade medular. As bordas das fraturas começam a sofrer ação osteoclástica de remodelação formando superfícies lisas e biseladas. Nas áreas de maior concentração cartilaginosa, a neovascularização penetra calcificando a cartilagem e favorecendo o processo de ossificação endocondral ampliando a placa de crescimento de neoformação óssea (HULSE; JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

Por fim, semanas ou meses após a fratura inicial, o calo ósseo liga as bordas das fraturas e inicia a última etapa conhecida como fase de remodelação. Esta fase caracterizase por intensa ação osteoclástica a fim de restaurar a anatomia óssea com restauração do canal medular. Não é rara a condição em que o osso é forte suficiente para ser considerado consolidado, mas do ponto de vista biológico, a ação de remodelamento permanece por longo prazo (HULSE; JOHNSON, 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005; BORRELI et al., 2012).

Embora, a maioria dos casos de tratamento de fratura adequado evolua satisfatoriamente, outro grande número absoluto falha. Em medicina humana e veterinária é relativamente comum a ocorrência de má-união, retardo de união ou mesmo a não-união dos segmentos das fraturas.

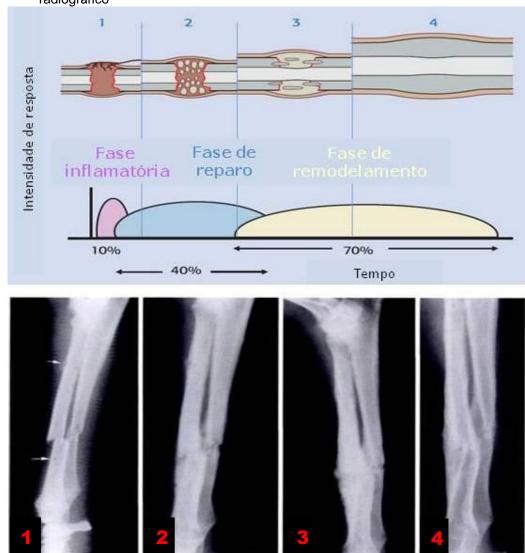


Figura 3 - Esquema de consolidação secundária de fratura em osso longo e acompanhamento radiográfico

Fonte: (JOHNSON, 2005 e THRALL, 2001; adaptado por SENOS, 2014).

Legenda: 1) Fase inflamatória com formação de hematoma; 2) Fase de reparo com rápida chegada de tecido de granulação; 3) Fase de remodelamento com formação de calo fibrocartilaginoso e 4) mineralização de calo com restauração da anatomia óssea

1.3 NÃO-UNIÃO DE FRATURA

Quando um sítio fratuário não é consolidado, é instaurado um quadro de não-união óssea (SCHILLER; TEITELBAUM, 2002).

Apesar dos avanços no tratamento de fraturas, estima-se que 5%-10% das fraturas em humanos na América do Norte ou Reino Unido avance com alguma complicação de consolidação (CANADIAN ORTHOPAEDIC TRAUMA SOCIETY - COTS, 2003; MILLS; HAMISH; SIMPSON, 2013). Nos Estados Unidos da América, são estimados cerca de

10000 casos de não-união de fratura por ano (HAK et al., 2014). No Brasil, faltam estudos epidemiológicos amplos, mas o percentual de 5% de não-união dentre os casos de fraturas de fêmur tratadas com placa bloqueada é descrito por Miyazaki et al. (2012) em estudo retrospectivo.

A falha na consolidação de fraturas gera problemas para o cirurgião e implicações funcionais, sociais e financeiras para o paciente (EINHORN, 1995; HECKMAN; SARASOHN-KAHN, 1997; CANADIAN ORTHOPAEDIC TRAUMA SOCIETY - COTS, 2003). Sem levar em consideração a morbidade do paciente e tempo não produtivo, o National Health Service do Reino Unido estimou que os custos de tratamento de uma não-união de fratura no Reino Unido variam de 28 mil a 320 mil reais por pessoa (MILLS; HAMISH; SIMPSON, 2013).

Em medicina veterinária, as não-uniões de fratura em ossos longos, também, parecem ser complicações relativamente comuns. Entretanto, a escassez de publicações nacionais e internacionais referentes a esse tema limita a contextualização do cenário global e custos anuais com tratamentos cirúrgicos.

Em estudo radiográfico, a não-união é caracterizada por defeitos entre as extremidades da fratura e cavidade medular ocluída, a menos que a estabilização do foco de fratura seja feita com um pino intramedular. É possível encontrar, ainda, as superfícies lisas na linha de fratura e esclerose do tecido ósseo (THRALL, 2001; FARROW, 2006).

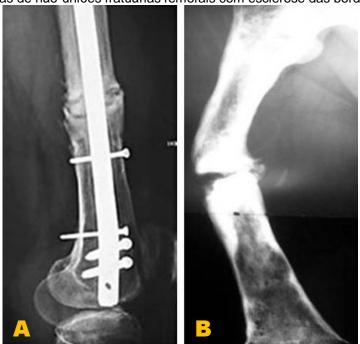


Figura 4 - Radiografias de não-uniões fratuárias femorais com esclerose das bordas fratuárias

Fonte: (GAO, 2013; CRISTANTE, 2011; adaptado por SENOS, 2013)

Legenda: A) quando a técnica de estabilização do foco impede o fechamento do canal medular e B) quando o canal medular fica ocluído

As causas dessas complicações são bem variadas. A não-união representa a falência do processo metabólico complexo que envolve diversas células, fatores reguladores neuroendócrinos e iônicos e proteínas morfogenéticas (SALTER, 2001; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; CANADIAN ORTHOPAEDIC TRAUMA SOCIETY - COTS, 2003). Aparentemente, o gênero, fatores genéticos, tabagismo, doenças metabólicas e carências nutricionais podem estar relacionados no processo (RAJASEKERAN; GIANNOUDIS, 2012; COPUROGLU; CALORI; GIANNOUDIS, 2013; DIMITRIOUS et al., 2013; POUNTOS et al., 2013).

A patogênese da não-união pode estar relacionada principalmente a fatores mecânicos como instabilidade ou interposição de tecidos no foco da fratura (CANADIAN ORTHOPAEDIC TRAUMA SOCIETY - COTS, 2003), além de infecção e alterações vasculares (SALTER, 2001; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002). Destes fatores, pode-se classificar basicamente as não-uniões de fraturas como eutróficas - com interposição de tecido entre os fragmentos - , atróficas - com déficit vascular evidente - e hipertróficas - representa bom aporte vascular, porém sem estabilidade necessária para promover o reparo e cicatrização do tecido ósseo – (JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005).

Dentre as causas das não-uniões atróficas destaca-se a laceração de tecidos moles adjacentes ao foco de fratura, incluindo o periósteo, e deficiências vasculares, sobretudo de características anatômicas (WELCH et al., 1997; SALTER, 2001; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; CANADIAN ORTHOPAEDIC TRAUMA SOCIETY - COTS, 2003). Provavelmente, a não-união atrófica é o tipo mais tipo mais difícil de tratar (PIERMATTEI; FLO DECAMP, 2006).

De modo geral, os tratamentos de não-uniões de fraturas instauradas por déficit vascular local utilizam técnicas cirúrgicas que preveem maior estabilidade do foco de fratura e debridamento das bordas da fratura a fim de promover melhora neovascular (RODRIGUEZ-MERCHAN; FORRIOL, 2004; BEICKERT et al., 2006). Entretanto, não parece ser muito claro que a melhor disposição dos fragmentos de fratura possa incrementar a vascularização local. Além dos altos custos envolvidos nestes tipos de tratamentos, os riscos do ato cirúrgico e aumento do tempo de morbidade do indivíduo, nos leva a pensar nas possibilidades de abordagens para estas complicações (BEAVER; BRINKER; BARRACK, 1997; BABHULKAR; PANDE; BABHULKAR, 2005).

Embora muitos estudos envolvendo fatores reguladores do crescimento ósseo - fator de crescimento transformante TGF-β, fator de crescimento endotelial vascular VGEF, plasma rico em plaquetas PRP, proteínas morfogenéticas de osso BMPs - venham sendo conduzidos como alternativa para o tratamento cirúrgico em quadros de não-união (RAMOSHEB et al., 2002; KAPLANSKY; DURNOVA, 2007; AZAD et al., 2009; KAIPEL et al., 2012), seus resultados são incipientes e muitas vezes inexplicados do ponto de vista dos

precisos fenômenos metabólicos. Em adição, são tratamentos pouco difundidos que costumam ter alto custo financeiro – embora alguns desses tratamentos custem menos que os cirúrgicos – (DAHABREH; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2007; DAHABREH et al., 2009) que, muitas vezes, inviabiliza o seu emprego rotineiro.

A maioria dos estudos experimentais envolvendo tratamentos não invasivos para a não-união, utilizam como modelo fraturas que não mimetizam adequadamente a isquemia local da fratura.

1.4 OS MODELOS EXPERIMENTAIS ATUAIS DE NÃO-UNIÃO DE FRATURA

Alguns modelos experimentais utilizam-se da produção de grandes defeitos segmentares ou instabilidade mecânica na fixação da fratura para gerar quadros de não-união (GARCIA et al., 2008; KRATZEL et al., 2008; OETGEN et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; HU et al., 2011; SCALICZKI et al., 2012). Entretanto, estes modelos não recriam os distúrbios metabólicos que podem interferir no processo de consolidação da fratura, limitando-se às questões mecânicas. Este tipo de não-união (mecânica) não pode ser utilizado para avaliar o efeito de drogas anabólicas no processo. Nestes modelos, a não-união não foi criada por efeitos biológicos locais, mas sim pela perda de contato entre os segmentos ósseos envolvidos na fratura (KOKUBO et al., 2003).

Cabe ressaltar que o periósteo cumpre papel fundamental na consolidação, à medida que suas células se diferenciam em osteoblastos determinando uma ossificação intramembranosa. O periósteo, portanto, é a principal estrutura envolvida na questão biológica da consolidação (WELCH et al., 1997; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002).

Dentre os modelos que recriam uma condição de falha vascular, o modelo experimental de Kaspar et al. (2008) de não-união de fratura parece inadequado. Embora a remoção do periósteo constitua técnica importante, à medida que os autores removeram, também, a medula óssea do osso fraturado, produziram uma condição além da conhecida em não-uniões e, portanto, alterou-se os mecanismos fisiopatológicos de não-união de fratura (MANOLAGAS; JILKA, 1995).

Já os modelos de Hietaniemi, Peltonen e Paavolainen (1995) e Kokubo et al. (2003) parecem aproximar-se da realidade clínica. Contudo, a curta remoção do periósteo (2mm das bordas da fratura), talvez, interfira nas técnicas morfométricas ósseas recomendadas para estudos de crescimento ósseo (DEMPSTER et al., 2013).

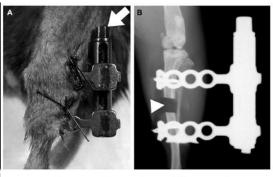
Figura 5 - Modelos experimentais de não-união de fratura óssea encontrados na literatura que utilizam diferentes técnicas

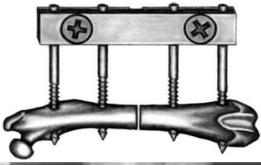
Hu et al, 2011. Modelo de não-união com falha segmentar. Modelo mais comum encontrado na literatura.

Kasper et al, 2008. Modelo com boa estabilidade no foco de fratura. Condição atrófica discutível pela remoção da medula óssea.

Hietaniemi *et al*, 1995.

Modelo com
características atróficas
boas. Limitação na análise
de crescimento ósseo
cortical.







Fonte: (HIETANIEMI, 1995; KASPER, 2008; e HU, 2011; adaptado por SENOS 2013).

Baseado nos modelos já descritos na literatura, nenhum modelo atualmente é definitivo e serve o propósito dos estudos para tratamentos de não-união atróficas.

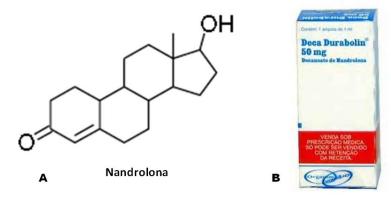
1.5 O DECANOATO DE NANDROLONA

O decanoato de nandrolona é um anabolizante esteroide andrógeno. Trata-se do primeiro derivado sintético da testosterona que teve suas propriedades anabólicas e androgênicas suficientemente separadas para uso clínico (KICMAN, 2008; BARCELOUX; PALMER, 2013). A remoção do grupo 19-metil foi o que possibilitou a redução dos efeitos androgênicos, mas com manutenção dos efeitos anabólicos comparado ao proprianato de testosterona (GAO; BOHL; DALON, 2005).

Como todos os anabolizantes dessa classe, seu efeito é exercido sobre vários tecidos no organismo, como músculos e ossos, por exemplo (MCGRIFF-LEE et al., 2005; KICMAN, 2008; GHIZONI et al., 2013; PIOVESAN et al., 2013).

O decanoato de nandrolona é gradualmente liberado do depósito intramuscular e subsequentemente hidrolisado em nandrolona (GAO; BOHL; DALON, 2005). O perfil anabólico da nandrolona, segundo estudos metabólicos realizado em humanos, demonstra os efeitos anti-catabólicos e poupador de proteínas, como também os efeitos favoráveis sobre o metabolismo do cálcio em sua maior absorção intestinal, menor taxa de excreção renal e aumento de massa óssea em humanos com osteoporose. Os efeitos anabólicos estão associados com a presença da enzima 5-α-redutase em tecidos contendo receptores androgênicos. Pela ação da 5-α-redutase a nandrolona passa à 5-α-dihidro-nandrolona (HOFBAUER; KHOSLA, 1999; KICMAN, 2008). Essa se liga mais fracamente aos receptores androgênicos do que a nandrolona (BELIDO et al., 1995). Isso explica o efeito relativamente forte da nandrolona em tecidos destituídos de atividade alta da 5-α-redutase.

Figura 6 – Representação gráfica da molécula de nandrolona (A) e fórmula comercial do decanoato de nadrolona (B)



Fonte: (Kicman, 2008; e www.mundo.anabolico.blogspot.com; adaptado por SENOS 2013).

A nandrolona tem demonstrado um aumento do teor mineral ósseo, detenção de perda óssea e redução da incidência de fraturas (TIDERMARK et al., 2004; BERIASHVILI; MENABDE; CHIKHLADGE, 2006; TENGSTRAND et al., 2007). Com isso, teve larga aplicação no tratamento da osteoporose. Apesar do efeito do decanoato de nandrolona estar bem documentado em relação ao aumento de massa muscular e indiretamente de massa óssea, seu efeito direto no tecido ósseo possui pouca documentação científica em estudos *in vivo* (AERSSENS et al., 1993; SCHOT; SCHUURS; KLOOSTERBOER, 1993; KAPLANSKY; DURNOVA, 2007; HEDSTRÖM et al., 2002). Em estudos *in vitro* demonstrouse a presença de receptores androgênicos em células "osteoblast-like" que estimulam a proliferação e diferenciação osteoblástica (KOUSTENI et al., 2007). Em modelos

experimentais de indução de osteopenia, o efeito da nandrolona está parcialmente documentado, tanto em prevenção como em tratamento de ratos com osteoporose induzida (BELIDO et al.,1995; XIAODONG et al., 2000).

O uso do decanoato de nandrolona em fraturas, ainda, é incipiente. A literatura contemporânea fornece apenas dados experimentais em coelhos com resultados que indicam um incremento no crescimento ósseo alcançado pela alta atividade osteoblástica e redução do tempo de tratamento da fratura (AHMAD et al., 2013).

Contudo, atualmente, não há definição dos efeitos da nandrolona como coadjuvante do tratamento das não-uniões de fraturas. Com essas características, temos o interesse em avaliar os aspectos morfológicos produzidos pelo decanoato de nandrolona em não-uniões de déficit vascular. Dessa forma, formulamos a pergunta: Será o decanoato de nandrolona capaz de promover crescimento ósseo em não-uniões de fratura de caráter atrófico?

1.6 OBJETIVO

Avaliar a influência do decanoato nandrolona no tratamento de não-uniões atróficas de fraturas induzidas em fêmures ratos.

- a) Desenvolver um modelo experimental de não-união de fratura com deficiência vascular que reproduza um quadro semelhante ao de não-união atrófica e, ainda, permita análises morfométricas:
- b) Testar nossa hipótese por meio de grupo controle e grupo experimental no qual utilizaremos o decanoato de nandrolona. Fazer análises qualitativas e quantitativas para caracterizar morfologicamente os efeitos do decanoato de nandrolona sobre fraturas não unidas com falha vascular.

1.7 JUSTIFICATIVA

Nossa proposta é justificada pelo relativo grande número de casos clínicos veterinários e humanos de não-união de fratura. No homem esta complicação pode afetar diretamente sua produtividade, bem como perdas econômicas oriundas não somente da menor produtividade por perda da morfologia e função, como dos custos de possíveis tratamentos invasivos. Em medicina veterinária, animais utilizados para trabalho, também,

sofrem com a morbidade e os custos de revisão cirúrgica podem interferir na decisão do tratamento.

Materiais e Métodos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COMITÊ DE ÉTICA

O experimento foi aprovado nas normas de ética estabelecias pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA-UFF), sob o registro número 170/2012 para execução das etapas experimentais nesta instituição. Para fins de registro e desenvolvimento de tese de doutoramento, o estudo foi aprovado, também, no Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA-FMVZ-USP) sob o protocolo número 2904/2013.

2.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Utilizamos 10 espécimes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar de criação convencional. Os espécimes foram produzidos e criados até os 2,5 meses de idade no Núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense (NAL-UFF) e, em sequência, cedidos ao Laboratório de Morfologia Experimental do Instituto Biomédico (LaMEx-UFF) para realização do experimento.

Durante todos os procedimentos, os animais estiveram alojados no Biotério 1 do LaMEx-UFF. Os ratos foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno com grade superior, de dimensões 30cm x 20cm x 14cm. Temperatura controlada de 24°C, umidade média de 50% e ciclos de luz de 12h dia/noite. Os animais tiveram ração própria para ratos Nuvilab® (valores nutricionais no Apêndice A) e água filtrada *ad libitum*.

Os animais passaram por 15 dias de adaptação ao ambiente e rotina do novo biotério antes de serem submetidos ao primeiro procedimento cirúrgico com a finalidade de reduzir o estresse dos animais.

2.3 ETAPAS EXPERIMENTAIS

O cronograma de execução de cada etapa experimental envolvendo espécimes vivos é representado pela figura 7.

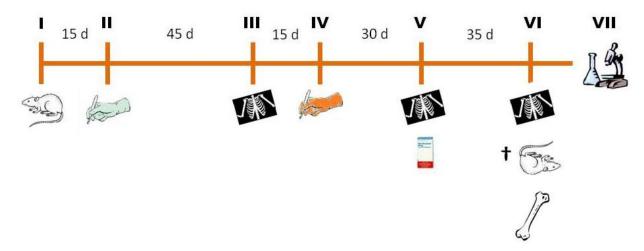


Figura 7 - Cronograma das etapas metodológicas in vivo do estudo

Fonte: (SENOS, R., 2014).

Etapa I – Captação dos animais

Os animais foram recebidos do NAL-UFF e acomodados no Biotério I do LaMEx-UFF, conforme previamente descrito.

Etapa II – Primeiro procedimento cirúrgico

A Etapa II ocorreu nas dependências do LaMEx-UFF.

O objetivo desta etapa era instalar o quadro de fratura óssea transversal na diáfise femoral esquerda por método cirúrgico. Desejava-se, ainda, que o quadro evoluísse ao estado de não-união de fratura com déficit vascular.

O procedimento anestésico foi realizado com aplicação de medicação préanestésica, acepromazina 0,75mg/kg intramuscular. Cinco a 10 minutos após, realizamos a aplicação da associação de cloridrato de quetamina/cloridrato de xilazina nas dosagens de 80mg/kg e 10mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal.

Após constatação de plano anestésico cirúrgico por ausência de reflexo palpebral e resposta a estímulo doloroso (compressão interdigital), realizou-se ampla tricotomia no membro esquerdo do animal, desde a coluna vertebral lombar, sacral e caudal, passando pela parede abdominal, até articulação társica. No membro pélvico, foram abordadas as faces lateral e medial.

Em seguida, foi realizada a antissepsia do membro com solução de clorexidine e clorexidine alcoólico e iniciado o ato cirúrgico.

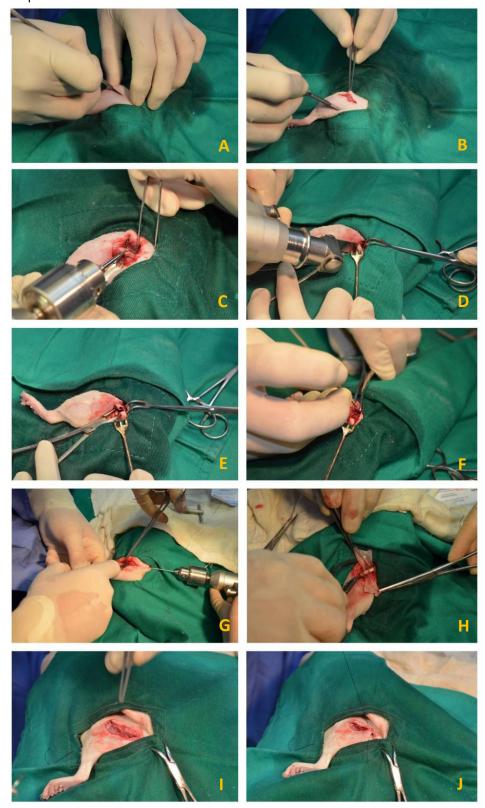
1- O acesso cirúrgico foi realizado por incisão cutânea do trocânter maior ao epicôndilo lateral femoral, utilizando cabo de bisturi n°3 e lâmina n°15 (Figura 8A);

- 2- Após divulsão de tecido subcutâneo com tesoura Spencer ponta fina/fina e pinça de dissecção anatômica, realizou-se diérese entre a borda cranial do músculo bíceps femoral e a borda caudal do músculo tensor da fáscia lata com objetivo de alcançar o plano cirúrgico ósseo com bisturi, tesoura e pinça de dissecção anatômica (Figura 8B);
- 3- O acesso final ao osso deu-se ao afastar a musculatura adjacente à diáfise femoral com auxílio da tesoura em movimento de divulsão;
- 4- O periósteo de toda a diáfise foi removido por raspagem com lixa para criar um ambiente de déficit vascular no osso (Figura 8C);
- 5- Com uso de serra oscilatória, a osteotomia completa e transversal foi procedida no terço médio da diáfise do fêmur (Figura 8D);
- 6- Em seguida, foi removido o endósteo de toda a diáfise de ambos os segmentos da fratura, se utilizando a rosca de um pino intramedular (Figura 8F);
- 7- A fratura foi estabilizada utilizando um pino intramedular rosqueado de 1,5mm: a) Realizou-se corte oblíquo na ponta obtusa do pino, com uso de alicate cirúrgico, e inserção do mesmo no fragmento proximal de forma retrógrada pelo canal medular, desde a extremidade da fratura até sua saída na fossa trocantérica femoral utilizando furadeira cirúrgica. b) Em seguida, a fratura foi reduzida e estabilizada com movimento normógrado do pino intramedular até atingir osso trabecular da epífise distal utilizando máquina furadeira cirúrgica (Figura 8G e Figura 9);
- 8- Isolou-se o foco de fratura e diáfise femoral da musculatura crural revestindo um artefato de látex, dreno de "penrose" n°2, nos dois fragmentos da fratura do fêmur. O objetivo desta etapa era impedir que vasos sanguíneos de tecidos adjacentes ao foco de fratura atuassem no processo de regeneração óssea, simulando a necrose tecidual gerada em casos clínicos de fraturas (Figura 8H);
- 9- FO ato cirúrgico 1 foi finalizado com a síntese dos tecidos divulsionados e incididos utilizando fio monofilamentar de nylon 3-0. Para a aproximação da musculatura, foi utilizado ponto simples contínuo. Para pele e tecido subcutâneo, foi efetuado ponto simples descontínuo (Figura 8I-J).

O pós-cirúrgico imediato foi realizado com administração subcutânea de antibiótico Enrofloxacina (10mg/kg) e analgésico Tramadol (5mg/kg).

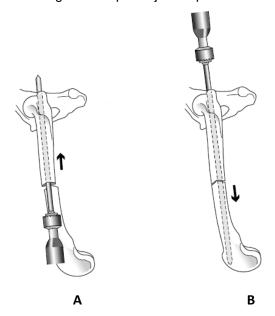
Após 12 horas do fim do ato cirúrgico, iniciou-se nova terapia por via subcutânea com antibiótico profilático Enrofloxacina (10mg/kg, 12-12h, durante 3 dias); anti-inflamatório Meloxicam (1mg/kg, 24-24h, durante 5 dias) e analgésico opióide Tramadol (5mg/kg, 12-12h, durante 3 dias).

Figura 8 - Sequência de técnica cirúrgica para instalação de quadro de não-unão de fratura no fêmur esquerdo de rato



Fonte: (SENOS, 2014). Legenda: Etapa II. A e B) diéreses cutânea e subcutânea, respectivamente; C) remoção do periósteo; D) osteotomia da diáfise femoral; E) fratura experimental; F) remoção do endósteo; G) fixação do pino intramedular; H) inserção de artefato isolante de látex; I e J) síntese subcutânea e cutânea, respectivamente

Figura 9 - Esquema de técnica cirúrgica de implantação do pino intramedular em fêmur de rato



Fonte: (JOHNSON, 2006).

Legenda: Etapa II. A) passagem retrógrada do pino e B) fixação normógrada.

Etapa III - Exame radiográfico I

Para constatação do sucesso cirúrgico da Etapa II, foram realizados exames radiográficos dos espécimes.

Eles foram deslocados até a Clínica Veterinária Be Happy na cidade de Petrópolis - RJ. Foram utilizados equipamento de radiografia FNX 90 CTI, chassi com placa de fósforo e leitura computadorizada com o FCR Prima Fuji modelo CR-IR391RU e impressora a Seco DKYPIX Prima.

Os animais foram submetidos a leve anestesia com objetivo de minimizar o estresse e facilitar a manipulação. O protocolo utilizado foi a associação cloridrato de quetamina / cloridrato de xilazina, 50mg/Kg e 5mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal.

Foram obtidas imagens radiográficas de ambos os membros pélvicos nas posições laterolateral e cranial-caudal.

A imagem sugestiva de fratura diafisária femoral, transversa e completa, bem como a constatação de artefato radiopaco, característico do pino intramedular foi evidenciada por 3 médicos veterinários.

Ao final do procedimento, os animais foram retornados ao Biotério 1 do LaMEx-UFF.

Etapa IV – Segundo Procedimento Cirúrgico

Quinze dias após a constatação radiográfica da fratura, foi realizado o segundo procedimento cirúrgico a fim de avaliar a esclerose das bordas da fratura e remover o artefato de látex (dreno "penrose"). Esta remoção teve por objetivo assegurar que, depois de instalada a não-união da fratura, os tecidos adjacentes e seus vasos não eram suficientes para promover a regeneração óssea. Além disso, não era desejado que o artefato de látex atuasse como barreira física para o reparo ósseo.

O procedimento anestésico e acesso cirúrgico foram executados igualmente aos descritos na Etapa II. Em seguida, removeu-se o artefato de látex (dreno de "penrose") utilizando tesoura Spencer, bisturi e pinça de dissecção anatômica. Foram observadas escleroses das bordas da fratura (Figura 10). Por fim, o ato cirúrgico 2 foi concluído de forma semelhante ao executado que o na Etapa II, incluindo, os cuidados pós-operatórios.

Figura 10 - Técnica cirúrgica de remoção do artefato isolante de látex de fêmur de rato e constatação de não-união de fratura





Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: A) remoção do artefato e B) foco da fratura após remoção com esclerose das bordas fratuárias

Etapa V – Exame radiográfico II e Início de terapia com decanoato de nandrolona

Antes de iniciar o protocolo de administração do anabolizante esteroide, decanoanto de nandrolona, em tratamento a não-união de fratura, novo exame radiográfico foi realizado para constatar este quadro.

O local, protoloco anestésico, equipamentos e posições radiográficas seguiram o mesmo padrão da etapa III.

Após serem observadas as não-uniões de fratura em todos os espécimes, os animais foram retornados ao Biotério 1 do LaMEx-UFF.

Aleatoriamente, os espécimes foram divididos em 2 grupos: grupo controle (GC) e grupo tratado com decanoato de nandrolona (GNan). Cada grupo continha 5 espécimes.

Ambos os grupos foram submetidos às mesmas condições, exceto a administração do decanoato de nandrolona (Deca Durabolin®), dosagem 1,5mg/kg, intramuscular, uma vez por semana durante quatro semanas realizada exclusivamente em GNan.

Após a última administração do decanoato de nandrolona, foi respeitada uma semana de carência para ação farmacológica da última aplicação da droga, antes de proceder a etapa VI.

Etapa VI – Exame radiográfico III, eutanásia e coleta de material para estudo morfológico

Como última etapa com animais vivos, foi realizado o terceiro exame radiográfico com objetivo de comparar os achados entre os grupos GC e GNan e, ainda, compará-los com o exame radiográfico II para avaliação da evolução morfológica após a administração do decanoato de nandrolona.

O local, protoloco anestésico, equipamentos e posições radiográficas seguiram os mesmos padrões das etapas III e V.

Em ao LaMEx-UFF com os animais, foram procedidas as eutanásias utilizando sobredosagem de Tiopental Sódico na dosagem em 100mg/kg, via intraperitoneal.

A dissecção anatômica para fins de coleta do fêmur foi realizada seguindo protocolo semelhante aos protocolos cirúrgicos das Etapas II e IV. Em seguida, o fêmur foi desarticulado proximalmente com incisão sobre a cápsula articular e ligamento da cabeça do fêmur na articulação coxo-femoral. Distalmente, os ligamentos da articulação tíbio-femoro-patelar foram transversalmente seccionados para a liberação do fêmur neste plano. Após a coleta dos fêmures, o pino intramedular foi removido cuidadosamente, obtendo-se dois fragmentos, proximal e distal (Figura 11). As amostras foram fixadas por imersão em solução aquosa de formaldeído tamponado 10%.



30_{mm}

Figura 11 - Fragmentos ósseos coletados do grupo tratado com decanoato de nandrolona (GNan) e do grupo controle (GC) para processamento histológico

Fonte: (SENOS, 2014).

Etapa VII – Preparo e análise das amostras

Após fixação do material por 2 meses, foram realizadas as análises macroscópicas qualitativas dos fragmentos das fraturas.

Em seguida, executamos a descalcificação das amostras para realização de análises mais apuradas.

A descalcificação foi procedida utilizando solução aquosa de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% pH 7,0. As soluções foram trocadas, rotineiramente, duas vezes por semana até que as amostras estivessem adequadas para processamento histológico. O tempo médio desta etapa foi de aproximadamente doze meses.

Apenas um fêmur de cada grupo, GC e GNan, não foram submetidos a descalcificação para realização de microscopia eletrônica de varredura.

1) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras não descalcificadas dos grupos GC e GNan foram analisadas qualitativamente por microscópica eletrônica de varredura.

Os fragmentos ósseos foram lavados em solução tampão. Em seguida, desidratamos crescentemente em solução aquosa de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, 98% e 100%). Após esta etapa, as amostras foram levadas à estufa a 37°C durante 24h. As amostras foram coladas em "stabs" metálicos utilizando cola de carbono. Em seguida, foram metalizadas com ouro "sputting" no equipamento EmitechVR K500. Por fim, os fragmentos ósseos foram analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP-Zeiss.

2) Microtomografia computadorizada

A microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (XCT) é uma técnica não destrutiva capaz de fornecer informações do interior dos objetos e, entre elas, avaliações volumétricas com objetivo de caracterizar a morfologia das amostras, que por sua vez pode ter natureza 2D ou 3D, em diferentes planos.

O ensaio de XCT foi conduzido no Laboratório de Instrumentação Nuclear do Departamento de Engenharia Nuclear da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LIN-UFRJ) (Figura 12). As amostras descalcificadas foram submetidas ao escâner de alta energia (SkyScan/Bruker 1173 X-Ray SkyScan, Kntich, Bélgica). As imagens foram obtidas com equipamento calibrado a operar com 70kV de voltagem, 114µA de corrente elétrica e filtro de alumínio de 1,0mm. O detector utilizado foi do tipo flat-panel, sendo possível alcançar imagens com matriz de 2240 x 2240 pixels e com o tamanho de pixel de 9,91µm. As projeções foram obtidas em 180º considerando uma média de 5 projeções a um passo angular 0,3º.

As projeções foram reconstruídas no programa Nrecon® SkyScan (version 1.6.9.4), cuja teoria é baseada em Feldkamp.

Para as visualizações 2D e 3D, foram utilizados os programas de visualização 3D SkyScan CTvox versão 3.0 (SkyScan, Kontich, Bélgica) e o programa Data Viewer versão 1.5.1.2 (SkyScan, Kontich, Bélgica).

Figura 12 - XCT realizada no LIN-UFRJ







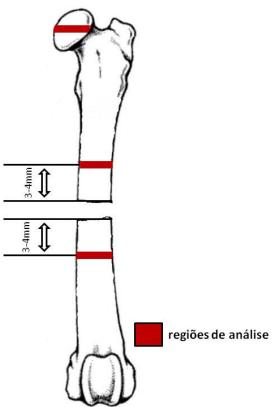
Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: A) fotografia do equipamento de XCT; B) exemplificação dos possíveis planos de análise e C) visualização de uma imagem radiográfica em tempo real.

As análises morfométricas foram executadas a partir de volumes de interesse (ROI), que relacionados com a quantidade de seções geraram determinados volumes de interesse (VOI). Nessa etapa, foi utilizado o programa CTan versão 1.14.4.1+ (Skyscan, Ltd, Bélgica). Os parâmetros analisados seguiram a padronização da literatura (HAHN et al, 1992; CHAPPARD et al, 2008, 2011; RECKER et al., 2011; DEMPSTER et al., 2013). Três regiões – cada uma com 0,2 mm de altura - de cada fêmur (Figura 13) foram analisadas, conforme explicitado a seguir:

- a) Análise de osso trabecular no terço médio da cabeça femoral, com objetivo de realizar controle positivo da ação da droga, uma vez que os efeitos do decanoato de nandrolona em ossos trabeculares já são conhecidos. Foram verificados o fator padrão de osso trabecular (Tb.PF), espessura de trabécula (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), volume ósseo (BV), percentagem de volume ósseo (BV/TV), conectividade das trabéculas (Conn) e número de Euler (NE).
- b) Análise de osso cortical da diáfise femoral do segmento proximal da fratura, cerca de 3-4mm proximal a linha de fratura. Foram analisados por estereologia – 21 planos transversais subsequentes por segmento – o volume de osso (BV) e a área de superfície do osso (BS). As análises 2D – apenas um plano transversal por segmento – contemplaram área significativa total se secção transversal do osso (B.Ar), perímetro significativo total de secção transversal do osso (B.Pm), espessura transversal (Cs.Th) e espessura trabecular em modelo de haste (Tb.Th.rd).
- c) Análise de osso cortical da diáfise femoral do segmento distal da fratura, cerca de 3-4mm distal à linha de fratura. Foram analisados os mesmos parâmetros do segmento proximal supracitado.

Figura 13 - Planos de secção transversal utilizados na quantificação estereológica e/ou bidimensional para osso cortical e trabeculado no fêmur esquerdo dos ratos estudados



Fonte: (SENOS, 2014).

3) Microscopia óptica

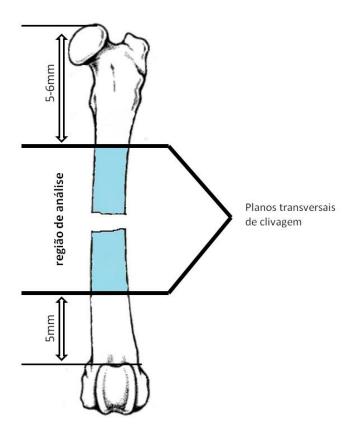
Estudos de microscopia óptica foram executados para caracterização das bordas das fraturas nos segmentos proximal e distal (Figura 14).

Os segmentos proximais foram clivados transversalmente a cerca de 5-6mm distal da borda proximal da cabeça do fêmur, enquanto os segmentos distais foram clivados cerca de 5mm proximal da borda proximal da tróclea do fêmur.

Em seguida, procederam-se as etapas clássicas de preparo histológico (desidratação, diafanização e inclusão em blocos de Paraplast®). Cada segmento femoral deu origem a um bloco contendo o segmento diafisário proximal ou distal, totalizando 16 blocos, dos quais 4 eram dos segmentos proximais do GC, 4 dos segmentos distais do GC, 4 dos segmentos proximais GNan e 4 dos segmentos distal do GNan. Dois cortes coronais de 5µm de cada bloco foram selecionados para confecção de cada lâmina histológica. As lâminas foram coradas de acordo com as técnicas a seguir:

- a) Hematoxilina-Eosina, para caracterização da amostra (Apêndice B);
- b) Picrossírius modificado, para quantificação de colágeno (Apêndice C);

Figura 14 - Esquema de planos de clivagem dos segmentos proximal e distal e áreas de osso cortical analisadas em fêmur esquerdo de rato na microscopia óptica



Fonte: (SENOS, 2014).

As lâminas foram observadas com auxílio do microscópio óptico Axioscópio Zeiss® e os resultados analisados em um microcomputador utilizando programa de morfometria específico Carl Zeiss Axiovision Viewer 4.8® (Berlim, Alemanha), seguindo processos de captação da imagem, calibração do equipamento, engenharia da imagem, mensuração dos campos nas lâminas de Picrossirius modificado, listagem dos dados e comparação dos resultados.

Para a quantificação de colágeno foram padronizadas as leituras de 5 campos aleatórios por lâmina a uma distância de até 2mm da linha de fratura de cada segmento femoral.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados quantitativos obtidos da microtomografia computadorizada e microscopia óptica foram analisados estatisticamente a fim de estabelecer um padrão para tais quesitos.

Consideramos como significância estatística p valor menor que 0,05.

Média, desvio padrão e o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon foram calculados para cada variante analisada utilizando o programa Epilnfo TM version 7.1.3 (Atalanta, Georgia, EUA) (ZAR, 1998).

Nas análises de percentual de colágeno, foi utilizado percentual médio de colágeno encontrado em cada segmento para cálculo de Mann-Whitney-Wilcoxon.

3 RESULTADOS

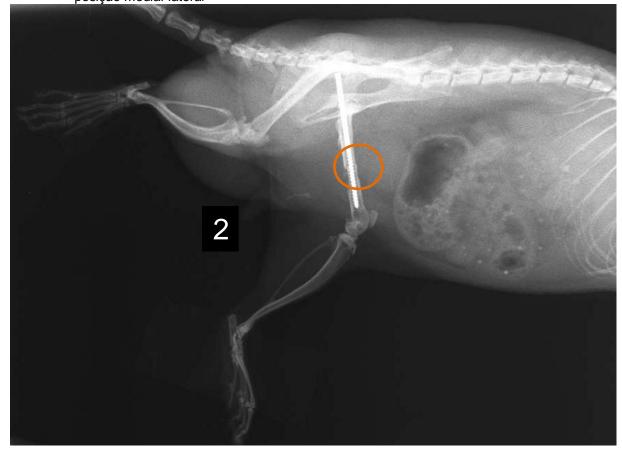
3.1 EXAMES RADIOGRÁFICOS

Os exames radiográficos periódicos (Etapa III, V e VI) revelaram a evolução do quadro de fratura, não-união e regeneração óssea a depender do grupo, GC ou GNan.

Etapa III

Durante esta Etapa, foram obtidas imagens sugestivas de fratura diafisária femoral, transversa e completa. Constatou-se, ainda, artefato radiopaco, característico do pino metálico no canal intramedular de todos os espécimes (Figura 15). O mesmo laudo foi fornecido por 3 médicos veterinários.

Figura 15 - Imagem radiográfica de membro pélvico esquerdo do rato número 2 (*Rattus norvegicus*), posição medial-lateral



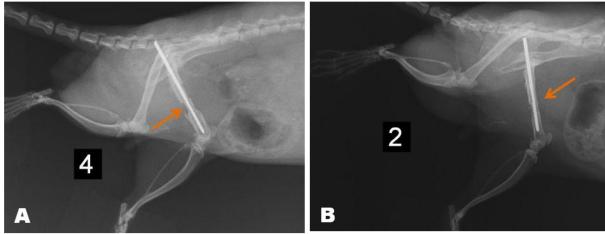
Fonte: (SENOS, 2014).

Nota: Em destaque (circunscrito): fratura diafisária transversal completa no fêmur esquerdo. Obs: presença de corpo estranho de alta densidade dentro do canal medular, característico de pino intramedular rosqueado.

Etapa V

Observou-se imagem sugestiva de fratura diafisária femoral, transversa e completa. Foi constatado, ainda, artefato radiopaco, característico do pino metálico no canal intramedular de todos os espécimes. Não foi notada imagem sugestiva de crescimento ósseo nas bordas da fratura de nenhum espécime (Figura 16). Considerando os exames da Etapa III, em avaliação temporal, foram diagnosticados quadros não-união de fratura em todos os espécimes. Esse laudo foi concordado por 3 médicos veterinários.

Figura 16 - Imagens radiográficas de membros pélvicos esquerdos de ratos. Posição latero-lateral



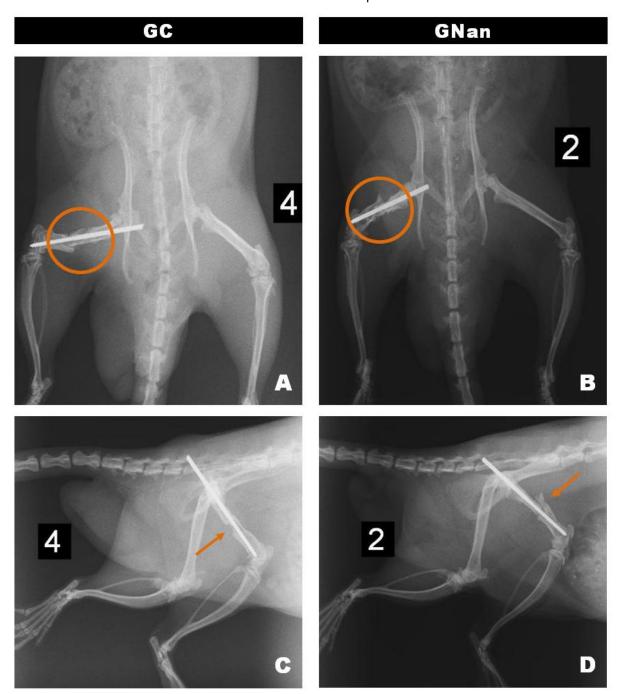
Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: A) espécime número 4 e B) espécime número 2. Em destaque (setas): fratura diafisária transversal completa no fêmur esquerdo. Obs: presença de corpo estranho de alta densidade dentro do canal medular, característico de pino intramedular rosqueado em ambos os animais.

Etapa VI

Já com os grupos GC e GNan definidos, após administração do decanoato de nandrolona no GNan, foram observadas imagens radiográficas diferentes. Ambos os grupos apresentaram imagens características de fratura diafisária femoral, transversa e completa com artefato radiopaco característico de pino metálico rosqueado no canal intramedular. Entretanto, o GNan apresentou bordas de fratura irregulares proeminentes sugestivas de crescimento ósseo. Por outro lado, alguns espécimes do GC apresentaram áreas de menor densidade na região cortical do foco da fratura sugestivo de reabsorção óssea (Figura 17). Três médicos veterinários foram consultados nos laudos.

Figura 17 - Imagens radiográficas de membros pélvicos de ratos do grupo controle e do grupo tratado com decanoato de nandrolona 125 dias após osteotomia



Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: A e C) espécime número 4 do GC. B e D) espécime número 2 do GNan. Fratura diafisária transversal completa no fêmur esquerdo em ambos os animais. Presença de corpo estranho de alta densidade dentro do canal medular, característico de pino intramedular rosqueado em todos os quadrantes. Em A e C não é observada expansão óssea. Em B e D, imagens radiopacas irregulares proeminentes características de crescimento ósseo. Comparar com figura 16.

3.2 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Os achados macroscópicos revelaram morfologia diferenciada nos fragmentos proximais e distais dos grupos GC e GNan.

Já durante a coleta, se notou que a retirada do pino intramedular dos espécimes GNan era dificultada. O pino estava comprimido no canal medular. Em contrapartida, nos espécimes GC, o pino intramedular estava relativamente livre dentro do canal medular.

Em relação às bordas das fraturas, houve estreitamento nos fragmentos proximais que se encaixavam nos fragmentos distais, deformando as bordas das fraturas. Particularmente, os fragmentos proximais do GC apresentaram as bordas das fraturas em formato de ponta de lápis. Consequentemente, os alargamentos das bordas das fraturas dos fragmentos distais do GC grupo foram bem acentuados.

Outros achados foram obtidos na morfologia do canal medular dos fragmentos distais. Os espécimes GNan apresentaram canal medular de contorno regular, enquanto no GC o canal apresentou contorno irregular.

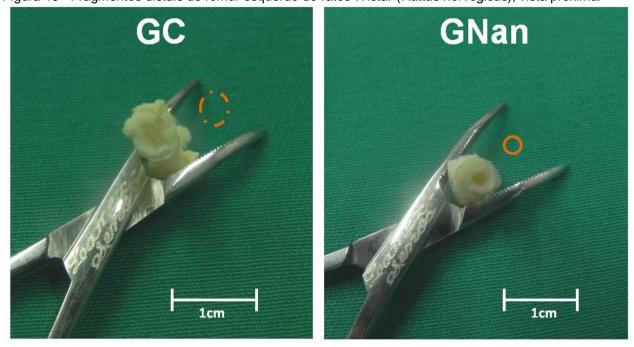


Figura 18 - Fragmentos distais de fêmur esquerdo de ratos Wistar (Rattus norvegicus), vista proximal

Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: À esquerda, grupo controle (GC). À esquerda, grupo tratado com decanoato de nandrolona (GNan). Destaque para tamanho e contorno da cavidade medular, menor e regular no GNan

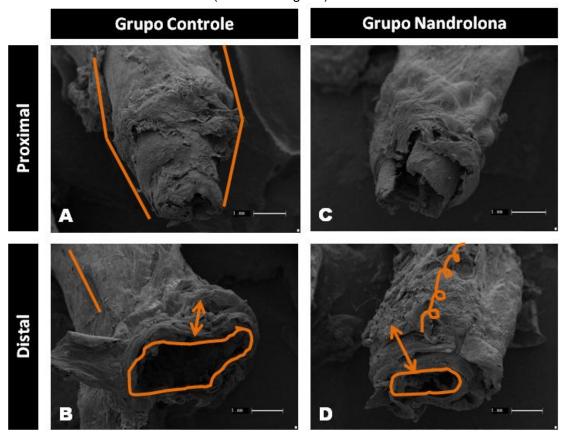
3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nas análises por microscopia eletrônica de varredura, foram encontradas peculiaridades para cada fragmento (proximal e distal) em cada um dos grupos (GNan e GC) (Figura 18).

O fragmento proximal GC mostrou-se com superfície irregular externa com áreas porosas, entremeadas de outras proeminentes. Essas imagens sugerem reabsorção óssea ou reabsorção óssea associada a focos de neoformação óssea (Figura 19). Destacou-se, ainda, a borda da fratura com formato de ponta de lápis como evidenciado macroscopicamente. Por outro lado, o fragmento proximal de GNan apresentou superfície irregular externamente, espessura cortical relativamente grande e canal medular de 1,5mm sugestivo de neoformação óssea, especialmente, nas camadas externas de osso.

Os fragmentos distais apresentaram morfologia ainda mais distintas. No GC, encontramos um canal medular bem dilatado na borda da fratura com diâmetro superior a 3,0mm, indicando que o pino intramedular estava mais livre nessa região. Além disso, a camada cortical desse segmento tinha espessura inferior a 1,0mm em determinadas regiões. A superfície externa estava irregular com imagem sugestiva de deformação. No GNan observamos superfícies externas muito irregulares. O canal medular atingiu seu diâmetro mínimo de aproximadamente de 1,5mm por contato com o pino intramedular. Adicionalmente, a espessura cortical superior a 1,5mm indicou intensa atividade proliferativa, uma vez que a cortical do GC apresentou espessura bem inferior.

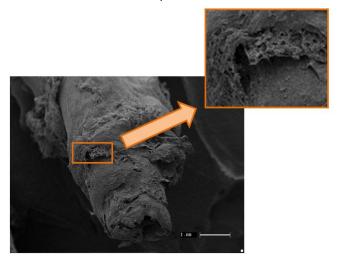
Figura 19 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura de fragmentos ósseos de fêmures de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)



Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: Destacam-se em A e B (GC) superfícies externas regulares fora do foco de fratura e borda em ponta de lápis (A) sugestiva de baixa proliferação óssea ou sequestro. C e D (GNan) apresentam áreas irregulares externas e cortical espessa (D) sugestiva de proliferação óssea

Figura 20 - Fotomicrografia da borda da fratura do fragmento proximal do grupo controle em quadro de não-união de fratura em fêmur esquerdo de rato



Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: Detalhe de região porosa, sugestiva de reabsorção óssea.

3.4 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

As análises qualitativas comparadas da microtomografia computadorizada corroboraram os resultados radiográficos e de microscopia eletrônica de varredura. As imagens externas de cada segmento revelaram diferenças claras entre GC e GNan evidenciando crescimento ósseo superior no GNan.

No GC, observou-se morfologia mais regular da diáfise femoral em ambos os segmentos quando comparadas ao GNan. Em adição, o fragmento proximal do GC apresentou área de estreitamento próxima à borda da fratura, como em ponta de lápis (Figura 20A).

Por outro lado, chama a atenção a deformação do GNan em relação à morfologia normal do fêmur. O colo femoral encontrou-se muito largo, gerando a falsa impressão de estar curto. Outro achado foi a discreta silhueta supracondilar do segmento distal e abaulamento das epífises medial e lateralmente à tróclea (Figura 20B).

Em plano coronal mais profundo foi possível observar a relação entre espessura da cortical e o diâmetro do canal medular. Notamos que nos segmentos proximais, o GC teve grande variação da espessura cortical e canal medular relativamente largo. Em contrapartida, o GNan mostrou cortical espessa e canal medular estreito.

Outra característica interessante foi a comparação entre as bordas das fraturas dos segmentos distais. No GC a borda apresentava grande dilatação, diferentemente do GNan.

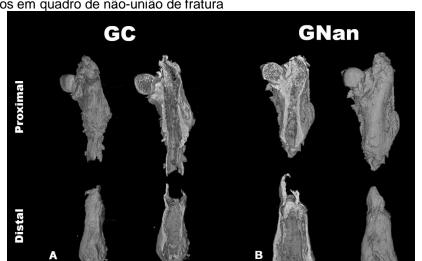


Figura 21 - Imagens radiológicas de microtomografia computadorizada de fêmures esquerdos de ratos em quadro de não-união de fratura

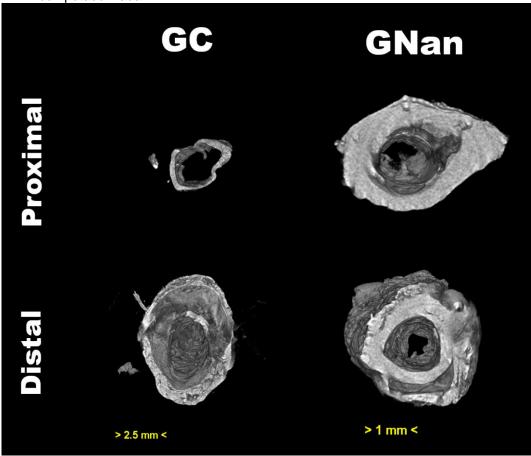
Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: Vista cranial. Análises externas e internas de secção coronal dos segmentos proximal e distal. A) grupo controle; B) grupo experimental

> 2.5 mm <

Nos planos transversais, foi possível destacar grande diferença entre as espessuras corticais e diâmetro medular nas regiões de análises quantitativas (Figura 21). GC apresentou uma delgada espessura cortical e amplo canal medular, enquanto GNan teve cortical espessa e canal medular em torno de 1,5mm.

Figura 22 - Aspectos morfológicos dos fêmures esquerdos de ratos analisados em microtomografia computadorizada



Fonte: (SENOS, 2014).

Nota: Planos transversais aproximadamente 3-4mm distantes das bordas das fraturas em ambos os segmentos proximais e distais

As análises morfométricas da cabeça femoral (controle positivo) destacaram maior massa óssea no GNan em comparação ao GC. As características promovidas pelo decanoato de nandrolona foram marcantes no aumento do volume ósseo, aumento do percentual de volume ósseo e aumento da espessura trabecular (Tabela 1). Nesses parâmetros, os dados coletados indicaram diferença significativa (p<0,05) entre GC e GNan no osso trabecular e, portanto, confirmaram o controle positivo do experimento, ou seja, o decanoato de nandrolona produziu efeitos no GNan.

As variantes de conectividade (Conn) e número de Euler (EN) da cabeça femoral indicaram que o decanoato de nandrolona não promoveu aumento significativo (p>0,05) das

conexões formadas entre as trabéculas ósseas. Além disso, o número de trabéculas ósseas (Tb.N), também, não indicou diferenças significativas (p>0,05) (Tabela 1).

Os valores absolutos em cada espécime podem ser encontrados no Apêndice D.

Tabela 1 - Análises morfométricas tridimensionais dos terços médios cabeças femorais de ratos realizadas em microtomografia computadorizada

Medida	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)
	GC	GNan
BV (mm³)	0,089 (± 0,031)	0,247 (± 0,057)
BV/TV (%)	21,031 ± 5,332	47,800 (± 8,101)
Tb.PF (mm ⁻¹)	14,536 (± 2,856)	-6,160 (± 6,249)
Tb.Th (mm)	0,077 (± 0,012)	0,106 (± 0,027)
Tb.N (mm ⁻¹)	2,815 (± 0,990)	4,570 (± 0,512)
Conn	71,25 (± 67,85)	103,25 (± 51,94)
EN	- 36,50 (± 44,66)	56,00 (± 75,37)

Legenda: GC = grupo controle; CNan = grupo tratado com decanoato de nandrolona; BV = volume ósseo; BV/TV = percentagem de volume ósseo; Tb.Pf = padrão de osso trabecular; Tb.Th = espessura trabecular óssea; Tb.N = número de trabéculas ósseas; Conn = conectividade entre as trabéculas ósseas; EN = número de Euler

Fonte: (SENOS, 2014).

Nota: As variantes BV, BV/TV, Tb.PF e Tb.Th apresentaram diferenças significativas no teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon

As análises quantitativas realizadas em planos transversais simples (2D) ou sequenciais (3D) em ossos corticais das diáfises femorais evidenciaram aumento de massa óssea cortical no GNan quando comparado ao GC tanto no fragmento proximal quanto no distal (Tabela 2).

O aumento do volume ósseo (BV) na análise 3D em GNan foi corroborado por seu correspondente bidimensional de área do osso (B.Ar). A maior superfície óssea (BS) observada em GNan durante análise tridimensionalmente foi acompanhada por seu análogo bidimensional de perímetro do osso (B.Pm). Além desses parâmetros, foi observada maior espessura de osso e maior espessura de cortical no GNan em análises 2D.

Os testes estatísticos de Mann-Whitney-Wilcoxon registraram diferença significativa (p<0,05) para todas as variantes analisadas.

Observamos, ainda, maior diferença entre as médias de GC e GNan referentes as variantes do segmento proximal que no segmento distal (Tabela 2).

Os valores absolutos em cada espécime podem ser encontrados nos Apêndices E-F.

Tabela 2 - Análises morfométricas bidimensionais e tridimensionais de osso cortical das diáfises femorais dos segmentos proximal e distal em fêmures de ratos realizada em microtomografia computadorizada

microtomograna computadonzada				
Segmento	Medida	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
femoral	Medida	GC	GNan	
Proximal	BV (mm³)	0,8369 (± 0,4044)	3,005 (± 2,229)	
	BS (mm²)	18,690 (± 9,377)	52,151 (± 34,666)	
	B.Ar (mm²)	4,089 (± 1,998)	14,430 (± 10,770)	
	B.Pm (mm)	42,7504 (± 18,363)	96,116 (± 52,231)	
	Cs.Th (mm)	0,179 (± 0,028)	0,280 (± 0,049)	
	Tb.Th(rd) (mm)	0,1628 (± 0,0178)	0,2068 (± 0,0121)	
Distal	BV (mm³)	1,466 (± 0,215)	2,751 (± 1,148)	
	BS (mm²)	32,981 (± 3,146)	56,361 (± 19,771)	
	B.Ar (mm²)	7,077 (± 1,032)	13,209 (± 5,552)	
	B.Pm (mm)	81,332 (± 4,181)	102,881 (± 38,222)	
	Cs.Th (mm)	0,173 (± 0,017)	0,259 (± 0,0131)	
	Tb.Th(rd) (mm)	0,161 (± 0,008)	0,197 (± 0,002)	

Legenda: GC = grupo controle; GNan = grupo tratado com decanoato de nandrolona; BV = volume ósseo; BS = superfície óssea; B.Ar = área óssea; B.Pm = perímetro ósseo; Cs.Th = espessura do osso; Tb.Th(rd) = espessura da cortical óssea.

Fonte: (SENOS, 2014).

Nota: Houve diferenças significativas (p<0,05) em todas as variantes analisadas nos testes não paramétricos de Mann-Whitney-Wilcoxon

3.5 MICROSCOPIA ÓPTICA

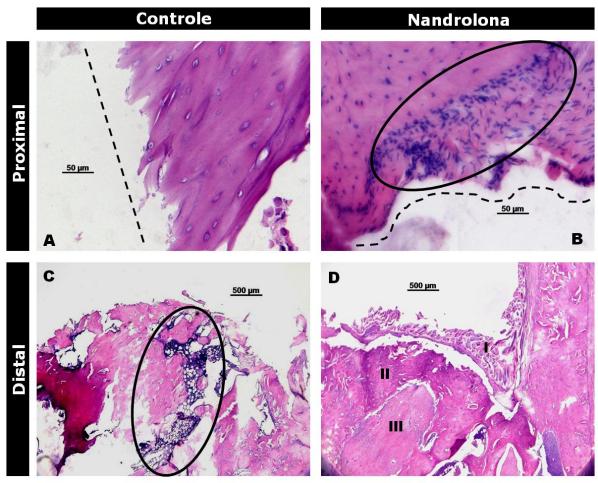
As lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina confirmaram as imagens radiográficas, de microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada ao revelarem o crescimento ósseo no GNan, mas não no GC (Figura 22).

As imagens captadas nos segmentos GC mostraram um tecido homogêneo e bem definido, sem maiores quantidades de núcleos celulares e, portanto, não indicaram a presença de grande quantidade de osteoblastos ou neoformação óssea no foco da fratura (Figura 22A). Encontrou-se, por outro lado, moderada atividade osteoclástica, evidenciada por áreas escuras com células multinucleadas delimitando grandes lacunas no tecido ósseo (Figura 22C).

No GNan, obteve-se achados morfológicos diferentes. Foram encontradas três regiões distintas (Figura 22D): 1) na borda da fratura, um tecido irregular com muitos núcleos grandes sugere intensa atividade osteoblástica na formação de novo tecido ósseo; 2) logo adjacente à borda da fratura, está demarcada uma região de núcleos celulares desalinhados e coloração de matriz extracelular mais intensa, característica de neoformação óssea e; 3) por fim, a região mais afastada da borda da fratura apresenta homogeneidade e distribuição relativamente organizada dos núcleos celulares. Em adição, encontramos matriz extracelular de coloração menos intensa.

Essas características sugerem tecido ósseo antigo.

Figura 23 - Fotomicrografias histológicas de tecido ósseo próximas a borda de fratura de fêmures esquerdos não-unidos de ratos do grupo controle (A e C) e do grupo tratado com decanoato de nandrolona (B e D)



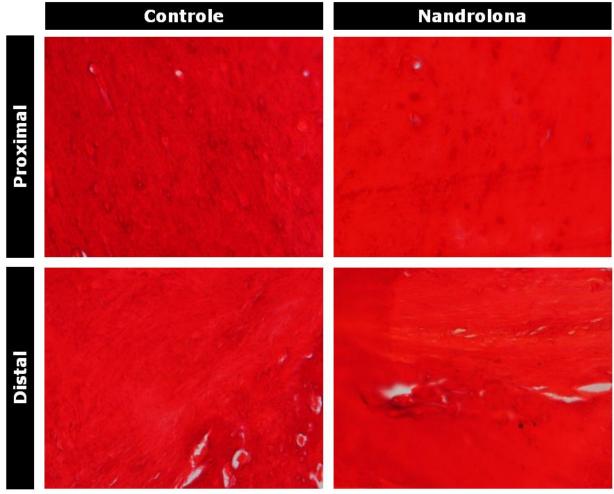
Fonte: (SENOS, 2014).

Legenda: A) borda regular com distribuição regular dos osteócitos. B) Destaque para área de atividade osteoblástica na borda da fratura. C) Destaque para região de atividade osteoclástica. D) Três regiões distintas de formação óssea na qual I = zona osteoblástica; II = zona de osso neoformado; III = osso formado anteriormente.

O estudo sobre colágeno revelou média de 94,96 \pm 2,58% no segmento proximal e 94,68 \pm 1,65% para o segmento distal no GC. No GNan, as médias foram 93,65 \pm 2,47% no segmento proximal e 96,57 \pm 0,82% no segmento distal (Figura 23). Não houve diferenças estatísticas significativas (p>0,05) entre os grupos.

Os valores absolutos de cada espécime encontram-se no Apêndice G.

Figura 24 - Fotomicrografias histológicas de tecido ósseo coradas com Picrossírius modificado para evidenciação das fibras colágenas na cor vermelha



Fonte: (SENOS, 2014).

Nota: Não houve diferenças significativas (p<0,05) em todas as variantes analisadas nos testes não paramétricos de Mann-Whitney-Wilcoxon

4 DISCUSSÃO

4.1 O MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental de não-união de fratura com déficit vascular proposto no presente estudo tinha por objetivo aproximar as condições experimentais daquelas encontradas nos casos clínicos de não-uniões atróficas. Nesses casos, o aporte sanguíneo no foco da fratura não é suficiente para favorecer os processos de cicatrização e regeneração, especialmente, nos primeiros dias após fratura (BROWNLOW et al., 2002; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; LU et al., 2007).

A literatura oferece diversos modelos com características diferentes. Grande parte promove a não-união de fratura por falha segmentar (FERREIRA et al., 2009; GARCIA et al., 2008; HU et al., 2011; KASPAR et al., 2008; OETGEN et al., 2008; SCALICZKI et al., 2012) que não corresponde aos casos clínicos de não-uniões atróficas, mas, sim, àqueles em que são necessários a realização de enxerto ósseo (KOKUBU et al., 2003).

Nesse sentido, o modelo proposto foi bem sucedido ao reproduzir o quadro de nãounião. Os achados radiográficos assemelham-se com a literatura para quadros clássicos de não-união (THRALL, 2001). As imagens radiográficas sugestivas de bordas de fratura escleróticas e com atividade osteoclástica evidente confirmam o processo. Adicionalmente, as bordas das fraturas encontradas foram semelhantes às descritas na literatura para nãounião atrófica (PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).

É sabido que a estabilização dos segmentos da fratura é fundamental para o reparo ósseo (SALTER; HARRIS, 1963; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; MEHTA et al., 2011). Usualmente, segmentos femorais produzidos por fraturas diafisárias transversas completas não possuem indicação apenas de pino intramedular para tratamento em animais. Normalmente, se opta por outra técnica, a fim neutralizar as forças resultantes da rotação entre os fragmentos (BEALE, 2004; STIFFLER, 2004; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005).

A utilização de um pino intramedular no modelo desenvolvido neste estudo decorre de limitações técnicas e econômicas. Não foi possível o acesso a fixadores externos ou placas que pudessem ser implantadas em fêmures de ratos.

Entretanto, os resultados indicaram que o uso de um pino intramedular foi eficiente para instalação do quadro de não-união de fratura. O diâmetro dos pinos – 1,5mm – utilizados foi pertinente por não terem ocorrido casos de migração dentro do canal medular. Para permitir movimentos de rotação entre os segmentos da fratura não é necessário utilizar

um pino frouxo dentro do canal medular. Nesse sentido, o modelo proposto trouxe avanço técnico em relação aos estudos prévios (HIETANIEMI; PELTONEN; PAAVOLAINEN, 1995; KOKUBO et al., 2003) que usaram pinos com diâmetro de 0,7mm e 1,25mm e tiveram migração em cerca de 10% dos espécimes. Consequentemente, nesses modelos descritos na literatura, perdeu-se a padronização da não-união em alguns espécimes que tiveram que ser descartados, o que torna esses modelos discutíveis do ponto de vista ético e econômico.

No intuito de melhorar a estabilização do foco fratuário, o modelo de Kaspar et al. (2008) utilizou um fixador externo como técnica. Entretanto, para criar a falha vascular, além de cauterizar o periósteo em 2mm de cada borda da fratura, removeu-se a medula óssea por aspiração. Desta forma, o ambiente fisiológico foi drasticamente modificado, produzindo um quadro pouco descrito na literatura, não-união óssea por doença medular.

A importância da vascularização no processo de reparo ósseo é conhecida. Da mesma forma, sua falha contribui para o retardo de união ou mesmo a não-união em fraturas do tipo atrófica (WELCH et al., 1997; REED et al., 2003; LU et al., 2007).

Alguns modelos, ao tentar criar falhas vasculares semelhantes aos casos clínicos de não-união atrófica, fizeram raspagem ou abrasão parcial do periósteo (HIETANIEMI; PELTONEN; PAAVOLAINEN, 1995; KOKUBO et al., 2003; DICKSON et al., 2007). Essa remoção comedida de 2mm é suficiente para gerar o quadro desejado, porém pode ser limitantes para análises morfométricas padronizadas em osso cortical em regiões fora do foco de fratura (CHAPARD et al., 2011; DEMPSTER et al., 2013).

O modelo proposto no atual estudo também destoou da literatura pela extensa remoção do periósteo e endósteo – de uma epífise a outra. Essa técnica fez com que houvesse menores diferenças osteogênicas entre o foco de fratura e outras áreas da diáfise femoral, permitindo análises quantitativas para verificação do crescimento ósseo fora do foco de fratura. Dessa forma, foi evitado que as deformações ocorridas nas bordas das fraturas oriundas das forças compressivas entre os fragmentos proximal e distal afetassem a padronização dos dados coletados.

Outro ponto característico deste modelo foi a inclusão de um artefato isolante de látex que impediu o contato do osso com tecidos adjacentes ricamente vascularizados durante os primeiros 60 dias pós-osteotomia. O longo período de manutenção do artefato isolante de látex é explicado pelo bem-estar animal, evitando-se sucessivos procedimentos anestésicos. Baseado nos estudos de Brownlow et al. (2002) e Reed et al. (2003) que estimaram que as não-uniões atróficas ocorrem por deficiências vasculares nas primeiras três semanas após a lesão óssea, foi projetada uma falha vascular que garantisse a não-união por longo período até que testes comprobatórios de não-união fossem realizados.

O longo período de estudo da não-união óssea, aparentemente, gerou deformidades nas regiões próximas ao foco fratuário. Acreditamos que as forças exercidas de um

fragmento contra o outro – gravidade – por prolongado tempo acarretou desvios das camadas corticais. Curiosamente, outros autores que estudaram modelos experimentais com uso de pinos intramedulares por tempo semelhante não relataram esses achados (HIETANIEMI; PELTONEN; PAAVOLAINEN, 1995; KOKUBU et al., 2003; KRATZEL et al., 2008).

Os achados de microscopia óptica e eletrônica de varredura indicaram que pode ocorrer atividade osteoblástica e osteoclástica nas não-uniões de fratura. Isso caracteriza o aspecto dinâmico do tecido durante a moléstia (DICKSON et al., 2007; SCHWABE et al., 2014) e corrobora o conceito que o foco de fratura está passível de interferências e mudanças desde que devidamente estimulado (GUERKOV et al., 2001; OGILVIE et al., 2012), mesmo após várias semanas da instalação da fratura.

4.2 SOBRE O USO DO DECANOATO DE NANDROLONA

Os resultados obtidos em cada técnica analítica mostraram que o decanoato de nandrolona interfere positivamente no incremento do reparo ósseo. As imagens sugestivas de crescimento ósseo na região do foco de fratura são evidentes nos exames radiográficos, na microscopia eletrônica de varredura, na microtomografia computadorizada e nas análises histológicas. A presença de receptores androgênicos em células de tecidos ósseos é conhecida tanto *in vivo* quanto *in vitro* (VANDERSCHUEREN; BOUILLON, 1995; ABU et al., 1997; SINNESAEL et al., 2013). Assim, é natural que alguns anabolizantes esteroides possuam atividade anabólica sobre o tecido ósseo (SINNESAEL et al., 2013).

Os mecanismos de ação produzidos por hormônios sexuais e seus derivados parecem bem complexos e a literatura atual ainda não fornece dados categóricos (MCGRIFF-LEE et al., 2005; SINNESAEL et al., 2013; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013). É possível que a ação de estímulos androgênicos possua efeitos diferentes entre machos e fêmeas. A literatura (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013) menciona que os receptores androgênicos em camundongos machos – não em fêmeas – tem efeito de proteção do osso trabecular em ações específicas nos osteoblastos e osteócitos responsáveis pela formação de novo tecido ósseo, mas não nos osteoclastos que têm por função a reabsorção óssea (AUGHEY; FRYE, 2001).

Por outro lado, os receptores estrogênicos em fêmeas e machos possuem ação direta sobre a regulação da apoptose de osteoclastos (FALAHATI-NINI et al., 2000). É descrito, também, que receptores estrogênicos são devidamente sinalizados por derivação aromatizante da testosterona e, portanto, a testosterona e seus derivados podem ter efeitos

anti-catabólicos sobre o tecido ósseo, incluindo as fêmeas (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013; SINNESAEL et al., 2013).

Em controversa às premissas anteriores, Pederson et al. (1999) e Michael et al. (2005) em estudos com culturas celulares concluíram que a testosterona tem efeitos diretos na inibição da formação de osteoclastos. Já o estrogênio não foi identificado como modulador da atividade osteoclástica.

O presente estudo não tinha por objetivo investigar os mecanismos bioquímicos resultantes da ação do decanoato de nandrolona no tecido ósseo; contudo, é evidente que a ação deste fármaco produziu aumento da atividade osteoblástica e declínio da atividade osteoclástica, mesmo em condições de falha vascular, segundo os achados histológicos. Dessa informação, se pode interpretar que, ao menos em machos, os hormônios androgênicos possuem efeitos importantes não apenas na formação de novo tecido ósseo como, também, em sua reabsorção (PIGNOLO; KASSEM, 2011).

Uma vez que o decanoato de nandrolona tem efeito anabólico semelhante ao do seu precursor testosterona, mas sem atividade androgênica intensa (KICMAN, 2008), é possível que seus efeitos ocorram igualmente nos receptores androgênicos. Consequentemente, existe lógica em considerar que outros anabolizantes esteroides derivados da testosterona, e com configuração molecular semelhante ao decanoato de nandrolona como a trembolona e estanozolol (KICMAN, 2008; BARCELOUX; PALMER, 2013), possam produzir efeitos semelhantes ao do decanoato de nandrolona. Nesse sentido, uma nova subárea da ortopedia e da bioquímica aplicada poderia emergir. Seria interessante testar os potenciais terapêuticos desses fármacos anabolizantes esteroides androgênicos em patologias ósseas caracterizadas por baixa atividade osteoblástica ou alta atividade osteoclástica, por exemplo, a osteoporose e outros tipos de não-união óssea.

A quantificação de crescimento ósseo na diáfise femoral, osso cortical, por microtomografia computadorizada indicou um aumento significativo da massa óssea em decorrência da ação do decanoato de nandrolona. Isso pode ser representado pelo aumento do volume ósseo (BV e B.Ar), aumento área de superfície cortical (BS, e B.Pm) e aumento da espessura da cortical (Cs.Th e Tb.Th(rd)) no GNan se comparado ao GC. Esses dados confirmam que o osso cortical cresceu em todas as direções do plano transversal em regiões distantes do foco de fratura, tornando as diáfises maiores e mais fortes.

Com base em tais dados, é possível explicar, ainda, que as forças compressivas no foco de fratura por tempo prolongado produziram menores deformações das bordas da fratura em GNan se comparado a GC, – como observados macroscopicamente, na microscopia eletrônica de varredura e na microtomografia computadorizada – porque GNan possuía osso cortical mais resistente.

Esses resultados quantitativos que caracterizaram a atividade anabólica do fármaco no tecido ósseo são consistentes com a literatura sobre o efeito do decanoato de nandrolona no tratamento de outras moléstias ósseas.

O ganho de massa óssea produzido por ação do decanoato de nandrolona foi relatado diversas vezes em estudos de tratamento da osteoporose (GEUSENS et al., 1986; NEED et al., 1987; PASSERTI et al., 1993; SCHOT; SCHUURS; KLOOSTERBOER, 1993; ERDTSIECK et al., 1994; ORWOLL, 1996).

Recentemente, Ahmad et al. (2013) e Beriashvili, Menabde e Chikhladge, (2006) aplicaram o decanoato de nandrolona em experimentos, respectivamente, de fraturas tibiais e mandibulares em coelhos. Ambos os estudos encontraram, também, propriedades osteoindutivas com aumento de massa óssea e redução do tempo necessário para a regeneração do osso no grupo tratado com o anabolizante esteroide.

Ao analisar os resultados da microtomografia computadorizada juntamente com os achados histológicos, pode-se deduzir que as medidas tomadas na microtomografia computadorizada subestimaram o crescimento ósseo real no foco de fratura. A alta atividade osteoblástica na região da borda da fratura apresentada na microscopia óptica não foi igualmente revelada nas regiões corticais onde foram analisados os parâmetros de crescimento ósseo por meio da microtomografia computadorizada.

Atualmente, a literatura não fornece técnicas morfométricas padronizadas (DEMPSTER et al., 2013) que sejam adequadas para a caracterização do crescimento ósseo no foco de uma fratura em processo de reparo. Embora o comprimento ósseo possa ser uma possível forma de mensuração, deve-se considerar que as distorções das bordas da fratura, por ação da gravidade em longo período, pode gerar viés. Além disso, o tamanho dos animais e seus pesos, que variam consideravelmente dentro de 140 dias de experimentação, são fatores que podem dificultar análises precisas.

Desta forma, é importante destacar que apesar dos dados morfométricos trazerem comprovação estatística sobre os efeitos do decanoato de nandrolona no tecido ósseo fraturado, não-unido e com falha vascular, eles retratam indiretamente o crescimento ósseo no foco da não-união. Certamente, as informações mais reais obtidas sobre os fenômenos que ocorrem na região de maior interesse de crescimento ósseo são aquelas obtidas qualitativamente no próprio foco de fratura.

No tratamento dos dados de controle radiográficos, embora os exames não tenham fornecido dados precisos dos fenômenos do crescimento ósseo no GNan, elas serviram para o monitoramento temporal do quadro de não-união das fraturas. Os achados foram categóricos ao demonstrar que nenhum espécime apresentou crescimento ósseo durante a instalação do quadro de não-união de fratura. Entretanto, após aplicação do decanoato de nandrolona, o GNan mostrou morfologia diversa com áreas irregulares de crescimento

ósseo próximo ao foco de fratura. Esses achados foram mais bem evidenciados e explicados no exame anatomopatológico macroscópico e na microscopia eletrônica de varredura. As análises radiográficas são instrumentos aceitáveis nas análises temporais clínicas de não-união de fratura, mas não retratam exatamente os fenômenos fisiológicos microscópicos de atividade osteoblástica e osteoclástica.

Outra questão pertinente diz respeito ao controle positivo da ação do decanoato de nandrolona por meio de análise do osso trabecular da cabeça femoral. Como era esperado, o GNan apresentou significativo aumento de massa óssea trabecular na região analisada (JEMORE et al., 1997; PANDE; FRANCIS, 2001; HUANG et al., 2002; HOURDÉ et al., 2009) confirmando a atividade do decanoato de nandrolona não apenas no osso cortical, mas, também, no osso trabecular. Contudo, mais uma informação importante pode ser extraída a serviço do decanoato de nandrolona no tratamento de osteopenia trabecular. O ganho de massa óssea no osso trabecular ocorreu por aumento da espessura das trabéculas ósseas (Tb.Pf) e não pela formação de novas trabéculas (Tb.N). Esses dados são corroborados pelos cálculos de conectividade (Conn) e número de Euler (EN) que não indicaram aumento de conexões entre as trabéculas ósseas, fenômeno que ocorre quando mais trabéculas são formadas. Essa informação sobre como ocorre o ganho de massa óssea no osso trabecular não foi encontrada na literatura consultada, mas é importante para o entendimento do grau de resistência do osso formado nas epífises dos ossos longos.

As análises quantitativas de percentual de colágeno no osso cortical sugerem que a qualidade, em especialmente, a resistência do osso neoformado no GNan não é inferior aos ossos normais. O colágeno é o componente principal dos ossos dos mamíferos. Sua estrutura fita-tripla helicoidal polipeptídica é relativamente longa. As fibras de colágeno estão dispostas nos ossos em camadas ordenadas e conferem ao tecido resistência às forças de tensão (ALBERTS et al., 1997). É conhecido que alterações qualitativas e quantitativas das moléculas de colágeno no tecido ósseo geram fragilidades e predispõem às fraturas (KNOTT et al., 1995; SHUSTER, 2005; WYNNYCKY et al., 2009; ORKOULA; VAIDAKI; KONTOYANNIS, 2012; DE WAARD et al., 2014). Nesse sentido, o osso formado pela ação do decanoato de nandrolona não deve apresentar fragilidade por quantidade desequilibrada de colágeno. Contudo, análises qualitativas do colágeno produzido no novo tecido poderão oferecer respostas adicionais.

Após toda a caracterização sobre o crescimento ósseo cortical no foco de não-união de fratura com grande falha vascular, é esperado que o decanoato de nandrolona atue na formação de novos vasos sanguíneos, mesmo que secundários à neoformação óssea. O presente estudo não utilizou técnicas quantitativas que confirmassem essa hipótese e a literatura consultada não fornece dados angiológicos sobre o efeito do decanoato de

nandrolona na angiologia dos ossos. É reconhecida a necessidade de novos estudos para evidenciar esta característica.

Sobre o modelo experimental desenvolvido e aplicado ao uso do decanoato de nandrolona no tratamento da não-união de fratura, é compreensível que os movimentos rotacionais impediram a cooptação das bordas da fratura e, consequente, reparo (BEALE, 2004; STIFFLER, 2004; JOHNSON; HOULTON; VANINI, 2005), mesmo que tenha ocorrido crescimento ósseo no foco de fratura. Isso reforça o conceito de que não basta formação de tecido ósseo para a consolidação da fratura (SALTER; HARRIS, 1963; SCHILLER; TEITELBAUM, 2002; MEHTA et al., 2011). Assim, é evidente que o tratamento de não-uniões com falha vascular ou atróficas demanda estabilidade entre as bordas das fraturas para ocorrer a consolidação. Caso contrário, possivelmente, o quadro de não-união atrófica evoluirá para hipertrófica.

Outra limitação deste estudo é o número amostral. Devido às dificuldades de aprovação de protocolos nos CEUAs e limitações econômicas, não foi obtido um número amostral suficiente para produção de uma curva de normalidade estatística nos dados morfométricos. Isso levou a utilização do teste não paramétrico de probabilidade estatística chamado de Mann-Whitney-Wilcoxon para cálculos de probabilidade. Contudo, como não foi observada nenhuma interseção de valores absolutos entre GC e GNan, exceto para a variante B.Pm, e como as informações morfométricas foram confirmadas em todos os valores de significância e todos os *p* valores calculados foram inferiores a 0,05, foi possível considerar as amostras heterogêneas.

Em relação à viabilidade econômica do decanoato de nandrolona, seu uso pode apresentar largas vantagens em relação aos demais tratamentos propostos para não-união de fraturas (RANOSHE et al., 2002; RODRIGUEZ-MERCHAN; FORNIOL, 2004; BEICKERT; HIERHOLZER; BUHREN, 2006; KAPLANSKY; DURNOVA, 2007; AZAD et al., 2009; KAIPEL et al., 2012). O custo relativamente baixo do decanoato de nandrolona estimulou sua aplicação no tratamento de osteoporose humana em diversas regiões do mundo (PFEILSCHIFTER, 2006; DIMAI et al., 2009; ORIMO et al., 2012). Baseado na cotação atual da droga (consulta realizada em 15/11/2014), o decanoato de nandrolona injetável tem valor médio de R\$0,60 por miligrama. O seu uso em dosagem igual à testada no presente estudo em um possível paciente humano adulto, de 70kg, geraria um custo de tratamento de aproximadamente R\$250,00. Trata-se de um valor insignificante se comparado aos 28 a 320 mil reais de um tratamento cirúrgico (WILLIAMS, 1994; MILLS; HAMISH; SIMPSON, 2013), o que possibilitaria o uso da droga, inclusive como coadjuvante ao tratamento cirúrgico. Seria viável, também, a utilização do decanoato em tratamentos médicos veterinários.

Mesmo que o uso de tratamentos terapêuticos coadjuvantes, como a BMP-7, reduzam o tempo de internação e morbidade do paciente e, talvez, a demanda cirúrgica, os

custos de doze mil reais por aplicação (DAHABREH; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2007; DAHABREH et al., 2009) são bem superiores aos custos estimados com o decanoato de nandrolona.

Certamente, a indicação terapêutica do decanoato de nandrolona é uma realidade distante. Considerações referentes ao uso humano e veterinário, efeitos terapêuticos e adversos e dosagem, dentre outras, devem ainda ser obtidas. Entretanto, a viabilidade econômica deve servir para estimular novos estudos.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

- O modelo de não-união de fratura proposto foi eficiente e reproduziu características atróficas em fêmur de rato, podendo ser considerado adequado para estudos de tratamentos terapêuticos de crescimento ósseo nessas condições;
- O pino intramedular de 1,5mm de diâmetro permitiu movimento rotacional em torno do eixo axial no foco da fratura, mas evitou a migração indesejada;
- As remoções integrais do periósteo e endósteo associadas ao uso temporário do artefato de látex produziram falha vascular na consolidação da fratura e permitiram análises morfométricas do osso cortical com menores distorções;
- O uso prolongado de pino intramedular em não-união de fratura produziu deformações das bordas da fratura em ambos os segmentos proximal e distal;
- O decanoato de nandrolona promoveu neoformação óssea em foco de não-união de fratura induzida com falha vascular com o incremento da atividade osteoblástica e redução da atividade osteoclástica;
- O decanoato de nandrolona promoveu aumento do volume ósseo cortical e aumento da espessura cortical fora do foco da fratura;
- O decanoato de nandrolona gerou aumento de massa óssea trabecular na cabeça femoral por aumento da espessura das trabéculas; entretanto, não produziu novas trabéculas ou ampliação das conexões entre elas;
- As análises morfométricas atuais padronizadas, para osso cortical, não se aplicam a todos os estudos de crescimento ósseo no foco da fratura:
- O osso neoformado por ação do decanoato de nandrolona não apresentou diferenças na quantidade de colágeno produzido em relação a um tecido ósseo normal;
- Existe uma viabilidade econômica para uso terapêutico do decanoato de nandrolona no tratamento das não-união de fratura ou, ainda, como coadjuvante aos tratamentos clássicos.

REFERÊNCIAS

- ABU, E. O.; HORNER, A.; KUSEC, V.; TRIFFITT, J. T.; COMPSTON, J. E. The localization of androgen receptors in human bone. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 10, p. 3493-3497, 1997.
- AERSSENS, J.; AUDEKERECKE, R. V.; GEUSENS, P.; SCHOT, L. P.; OSMAN, A. A. Mechanical properties, bone mineral content, and bone composition (collagen, osteocalcin, IGF-I) of the rat femur: influence of ovarectomy and nandrolone decanoate (anabolic steroid). **Calcified Tissue International**, v. 45, p. 360-366, 1993.
- AHMAD, F.; YUNUS, S. N.; ASGHAR, A.; FARUQI, N. A. Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits A study on experimental model. **Journal of Clinical Diagnosis Research**, v. 7, n. 1, p. 93-96, 2013.
- ALBERTS B.; BRAY D.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WATSON J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 1997. 1294 p.
- AUGHEY E.; FRYE F. L. **Comparative veterinary histology with clinical correlates**. London: Manson Publishing Ltd., 2001. 269 p.
- AZAD, V.; BREITBART, E.; AL-ZUBE, L.; YEH, S.; O'CONNOR, J. P.; LIN, S. S. rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 23, n. 4, p. 267-276, 2009.
- BABHULKAR, S. S.; PANDE, K.; BABHULKAR, S. Nonunion of diaphysis of long bones. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 431, p. 50-56, 2005.
- BARCELOUX, D. G.; PALMER, R. B. Anabolic-androgen steroids. **Disease-a-Month**, v. 59, n. 6, p. 226-248, 2013.
- BEALE, B. Orthopedic clinical techniques femur fracture repair. **Clinical Tecnhiques in Small Animal Pratice**, v. 19, n. 3, p. 134-150, 2004.
- BEAVER, R.; BRINKER, M. R.; BARRACK, R. L. An analysis of actual cost of tibial nonunions. **The Journal of the Louisiana State Medical Society**, v. 149, n. 4, p. 200-206, 1997.
- BEICKERT, R.; HIERHOLZER, C.; BÜHREN, V. Dyaphiseal nonunion of the humerus. **Trauma und Berufskrankheit**, v. 8, n. 3, p. 169-176, 2006.
- BELIDO, T.; JILKA, R. L.; BOYCE, B. F.; GIRASOLE, G.; BROMERYER, H.; DALRYMPLE, S. A.; MURRAY, R.; MANALOGAS, S. C. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgen. The role of the androgen receptor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 6, p. 2886-2895, 1995.
- BERIASHVILI, G. K.; MENABDE, G. K.; CHIKHLADZE, R. T. Morphological peculiareties of consolidation of experimental mandible fractures by osteosynthesis using kollapan and retabolil. **Georgian Medical News**, v. 136, p. 105-108, 2006.
- BORRELL,I J.; PAPE, C.; HAK, D.; HSU, J.; LIN, S.; GIANNOUDIS, P.; LANE, J. Physiological challenges of bone repair. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 26, n. 12, p. 708-711, 2012.

BROWNLOW, H. C.; REED, A.; HAMISH, A.; SIMPSON, R. W. The vascularity of atrophic non-unions. **Inury**, v. 33, n. 2, p. 145-150, 2002.

CANADIAN ORTHOPAEDIC TRAUMA SOCIETY. (COTS). Nonunion following intramedullary nailing with and without reaming. Results of a multicenter randomized clinical trial. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85, n. 11, p. 2093-2096, 2003.

CALHOUN, M. L. A cytological study of costal marrow. I. The adult horse. **American Journal Veterinary Research**, v. 15, p. 181-196, 1954.

CAMPBELL, J. R. Radiology of the epiphysis. **Veterinary Radiology**, v. 9, p. 11-20, 1968.

CHAPPARD, D.; BASLÉ, M. F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. Trabecular bone microarchitecture: a review. **Morphologie**, v. 92, n. 299, p. 162-170, 2008.

CHAPPARD, D.; BASLÉ, M. F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 8, p. 2225-2240, 2011.

COPUROGLU, C.; CALORI, G. M.; GIANNOUDIS, P. V. Fracture non-union: who is at the risk? **Injury**, v. 44, n. 11, p. 1379-1382, 2013.

DAHABREH, Z.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P. V. Health economics: A cost analysis of treatment of persistent fractures non-unions using bone morphogenetic protein-7. **Injury**, v. 38, n. 3, p. 371-377, 2007

DAHABREH, Z.; CALORI, G. M.; KANAKARIS, N. K.; NIKOLAOU, V. S.; GIANNOUDIS, P. V. A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone-grafting or bone morphogenetic protein-7. **International Orthopaedics**, v. 33, n. 5, p. 1407-1414, 2009.

DEMPSTER, D. W.; COMPSTON, J. E.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R.; PARFITT, M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 1, p. 1-16, 2013.

DENNY H. R.; BUTTERWORTH S. J. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2006. 496 p.

DE WAARD, E. A. C.; VAN GEEL, T. A. C. M.; SAVELBER, H. H. C. M.; KOSTER, A.; GENSEN, P. P. M. M.; VAN DEN BERGH J. P. W. Increased fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus: an overview of the underlying mechanisms and the usefulness of imaging modalities and fracture risk assessment tools. **Maturitas**, v. 79, n. 3, p. 265-274, 2014.

DICKSON, G. R.; GEDDIS, C.; FAZZALARI, N.; MARSH, D.; PARKINSON, I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed/nonunion fracture. **Journal of Orthopedic Research**, v. 26, n. 5, p. 729-736, 2007.

DIMAI, H. P.; PIETSCHMANN, P.; RESCH, H.; PREISINGER, E.; FAHRLEITNER-PAMMER, A.; DOBNIG, H.; KLAUSHOFER, K. Austrian guidance for the pharmacological treatment of osteoporosis in postmenopausal women – update 2009. Wiener **Medizinische Wochenschrift**, v. 159, n. S122, p. 1-34, 2009.

- DIMITRIOU, R.; KANAKARIS, N.; SOUCACOS, P. N.; GIANNOUDIS, P. V. Genetic predisposition to non-union: evidence today. **Injury**, v. 44, n. 12, p. S50-S53, 2013.
- DYCE K. M.; SACK W. O.; WENSING C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2010. 834 p.
- EINHORN, T. A. Enhancement of fracture healing. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 77, n. 6, p. 940-956, 1995.
- ERDTSIECK, R. J.; POLS, H. A. P.; VAN KUIJK, C.; BIRKENHAGER-FRENKEL, D. H.; ZEELENBERG, J.; KOOY, P. P.; BIRKENHAGER, J. C. Course of bone mass after hormonal replacement therapy with and without addition of nandrolone decanoate. **Journal of Bone and Mineral Research** v. 9, n. 2, p. 277-283, 1994.
- EURELL J. A. C. Veterinary Histology. Wyoming: Teton NewMedia, 2004. 110 p.
- FALAHATI-NINI, A.; RIGGS, B. L.; ATKINSON, E. J.; O'FALLON, W. M.; EASTELL, R. KHOSLA, S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1553-1560, 2000.
- FARROW C. S. **Veterinária diagnóstico por imagem do cão e gato**. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2006. 748 p.
- FERREIRA, M. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, L. P. M.; FRANCO, R. S.; MELLO, N. B.; AMARAL, A. C.; SCHANAIDER A. Modelo experimental em ratos para o desenvolvimento de pseudoartrose. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 36, n. 6, p. 514-518, 2009.
- GAO, W.; BOHL, C. E.; DALON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2005.
- GARCIA, P.; HOLSTEIN, J. H.; MAIER, S.; SCHAUMLÖFFEL, H.; AL-MARRAWI, F.; MENGER, M. D. Development of a reliable non-union model in mice. **Journal of Surgery Research**, v. 147, n. 1, p. 84-91, 2008.
- GETTY R. **Sisson/Grossman Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 1986. 2000 p.
- GEUSENS, P.; DEQUEKER, J. Long-term effect of nandrolone decanoate, 1α hydroxyvitamin D3 or intermittent calcium infusion therapy on bone mineral content, bone remodeling and fracture rat in sympomatic osteoporotic: a double-blind controled study. **Bone and Mineral**, v. 1, n. 4, p. 347-357, 1986.
- GHIZONI, M. F.; BERTELLI, J. A.; GRALA, C. G.; DA SILVA, R. M. The anabolic steroid nandrolone enhances motor and sensory functional recovery in rat median nerve repair with long interpositional nerve grafts. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 27, n. 3, p. 269-276, 2013.
- GUERKOV, H. H.; LOHMANN, C. H.; LIU, Y.; DEAN, D. D.; SIMON, B. J.; HECKMAN, J. D.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Pulsed electromagnetic fields increase growth factor release by nonunion cells. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 384, p. 265-279, 2001.

- HAK, D. J.; FITZPATRICK, D.; BISHOP, J. A.; MARSH, J. L.; TILP, S.; SCHNETTLER, R.; SIMPSON, H.; ALT, V. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issue, and financial aspects. **Injury**, v. 45, n. S2, p. S3-S7, 2014.
- HAHN, M.; VOGEL, M.; POMPESIUS-KEMPA, M.; DELLING, G. Trabecular bone pattern factor a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. **Bone**, v. 13, n. 4, p. 327-330, 1992.
- HEDSTRÖM, M.; SJÖBERG, K.; BROSJÖ, E.; ASTROM, K.; SJÖBERG, H.; DALEN, N. Positive effects of anabolic steroid, vitamin D and calcium on muscle mass, bone mineral density and clinical function after a hip fracture. A randomised study of 63 women. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, n. 4, p. 497-503, 2002.
- HECKMAN, J. D.; SARASOHN-KAHN, J. The economics of treating tibia fractures: the cost of delayed unions. **Bulletin of NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 56, n. 1, p. 63-72, 1997.
- HIETANIEMI, K.; PELTONEN, J.; PAAVOLAINEN, P. An experimental model for nonunion in rats. **Injury**, v. 26, n. 10, p. 681-686, 1995.
- HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. **European Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 271-286, 1999.
- HOURDÉ, C.; JAGERSCHMIDT, C.; CLEMENT-LACROIX, P.; VIGNAUD, A.; AMMANN, P.; BUTLER-BROWNE, G. S.; FERRY, A. Androgen replacement therapy improves function in male rat muscles independently of hypertrophy and activation of the Akt/mTOR pathway. **Acta Physiologica**, v. 195, n. 4, p. 471-482, 2009.
- HU, C. T.; OFFLEY, S. C.; YASEEN, Z.; O'KEEFE, R. J.; HUMPHREY C. A. Murine model of oligotrophic nonunion. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 25, n. 8, p. 500-505, 2011.
- HUANG, R. Y.; MILLER, L. M.; CARLSON, C. S.; CHANCE, M. R. Characterization of bone mineral composition in the proximal tibia of cynomolgus monkeys: effect of ovariectomy and nandrolone decanoate treatment. **Bone**, v. 30, n. 3, p. 492-497, 2002.
- HUGHES, H. The factors determining the direction of the canal for the nutrient artery in long bones of mammals and birds. **Acta Anatomica**, v. 15, p. 261, 1952.
- HULSE D. A.; JOHNSON A. L. Fundamentos de cirurgia ortopédica e tratamento de fraturas. In: FOSSUM T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. p. 787-977.
- HUTH, A. Current concepts of fracture healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 249, p. 265-284, 1989.
- JEROME, C. P.; POWER, R. A.; OBASANJO, I. O.; REGISTER, T. C.; GUIDRY, M.; CARLSON, C. S.; WAEVER, D. S. The androgenic anabolic steroid nandrolone decanoate prevents osteopenia and inhibits bone turnover in ovariectomized cynomolgus monkeys. **Bone**, v. 20, n. 4, p. 355-364, 1997.
- JOHNSON, A. L.; HOULTON J. E. F.; VANINI R. **AO Principles of fracture management in the dog and cat**. Clavadelerstrasse: AO Publishing, 2005. 529 p.
- KAIPEL, M.; SCHÜTZENBERGER, S.; SHULTZ, A.; FERGUSON, J.; SLEZAK, P.; MORTON, T. J.; GRIENSVEN, M. V.; REDL, H. BMP-2 but not VEGF or PDGF in Fibrin matrix supports bone healing in a delayed-union rat model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 10, p. 1563-1569, 2012.

- KAPLANSKIÄ, A. S.; DURNOVA, G. N. Role of insufficient hormone production in development of osteopenia in consequence of physical loads defficiency. **Aviakosmicheskaya Ekologicheskaya Meditsina**, v. 41, n. 6, p. 13-7, 2007.
- KASPAR, K.; MATZIOLIS, G.; STRUBE, P.; SENTÜRK, U.; DORMANN, S.; BAIL, H. J.; DUDA, G. N. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 12, p. 1649-1655, 2008.
- KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 502-21, 2008.
- KNOTT, L.; WHITEHEAD, C. G.; FLEMING, R. H.; BAILEY, A. J. Biochemical changes in collagen matrix of osteoporotic avian bone. **Biochemical Journal**, v. 310, n. 3, p. 1045-1051, 1995.
- KOKUBO, T.; HAK, D. J.; HAZELWOOD, S. J.; REDID, A. H. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. **Journal Orthopaedic Research**, v. 21, n. 3, p. 503-510, 2003.
- KOUSTENI, S.; ALMEIDA, M.; HAN, L.; BELLIDO, T.; JILKA, R. L.; MANOLAGAS S.C. Induction of osteoblastic differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of estrogen receptor. **Molecular Cellular Biology**, v. 27, n. 4, p. 1516-1530, 2007.
- KRATZEL, C.; BERGMANN, C.; DUDA, G.; GREINER, S.; SCHMIDMAIER, G.; WILDERMANN, B. Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 9, p. 135, 2008.
- LU, C.; MICLAU, T.; HU, D.; MARCUCIO, R. S. Ischemias leads do delayed-union during fracture healing: a mouse model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 1, p. 51-61, 2007.
- MANOLAGAS, A. C.; JILKA, R. L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 305-311, 1995.
- MANOLAGAS, S. C.; O'BRIEN, C. A.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 12, p. 699-712, 2013.
- MCGRIFF-LEE, N.; KALANTARIDOU, S. N.; PUCINO, F.; CALIS, K. A. Effects of androgen on bones of men and women. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 51-66, 2005.
- MCLEAN, F. C. The ultrastructure and function of bone. **Science** v. 127, p. 451-456, 1958.
- MEHTA, M.; DUDA, G. N.; PERKA, C. P.; STROBE, P. Influence of gender and fixation stability on bone defect healing in middle-aged rats: a pilot study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 11, p. 3102-3110, 2011.
- MICHAEL, H.; HÄRKÖNEN, P. L.; VÄÄNÄNEN, H. K.; HENTUNEN, T. A. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 12, p. 2224-2232, 2004.

- MILLS, L. A.; HAMISH, A.; SIMPSON, R. W. The relative incidence of fracture non-union in the Scottish population (5.17 million): a 5-year epidemiological study. **BMJ**, v. 3, n. 2, 002276, 2013. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396560>. Acesso em: 26 nov. 2014.
- MIYAZAKI, A. N.; ESTELLES, J. R. D.; FREGONEZE, M.; SANTOS, P. D.; SILVA, L. A.; SELLA, G.V.; ISHIOKA, F.E.; ROSA, J.P.; CHECCHIA, S.L. Evaluations of the complications of treatment of the proximal extremity of the humerus using a locking plate. **Revista Brasileita de Ortopedia**, v. 47m, n. 5, p. 568-574, 2012.
- NEED, A. G.; MORRIS, H. A.; HARTLEY, T. F.; HOROWITZ, M.; NORDIN, B. E. Effects of nandrolone decanoate on forearm mineral density and calcium metabolism in osteoporotic postmenopausal women. **Calcified Tissue International**, v. 41, p. 7-10, 1987.
- OETGEN, M. E.; MERREL, G. A.; TROIANO, N. W.; HOROWITZ, M. C.; KACENA, M. A. Development of a femoral nonunion model in the mouse. **Injury**, v. 39, n. 10, p. 1119-1136, 2008.
- OGILVIE, C. M.; LU, C.; MARCUCIO, L.; LEE, M.; THOMPSON, Z.; HU, D.; HELMS, J. A.; MICLAU, T. Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model. **The lowa Orthopaedic Journal**, v. 32, p. 90-94, 2012.
- ORIMO, H.; NAKAMURA, T.; HOSOI, T.; IKI, M.; UENISHI, K.; ENDO, N.; OHTA, H.; SHIRAKI, M.; SUGIMOTO, T.; SUZUKI, T.; SOEN, S.; NISHIZAWA, Y.; HAGINO, H.; FUKUNAGA, M.; FUJIWARA, S. Japanese 2011 guidelines for prevention and treatment of osteoporosis executive summary. **Archives of Osteoporosis**, v. 7, n. 1-2, p. 3-20, 2012.
- ORKOULA, M. G.; VARDAKI, M. Z.; KONTOYANNIS, C. G. Study of bone matrix changes induced by osteoporosis in rat tibia using Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 63, p. 404-408, 2012.
- ORWOLL, E. S. Androgens as anabolic agents for bone. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 7, n. 3, p. 77-84, 1996.
- PANDE, I.; FRANCIS, R. M. Osteoporosis in men. **Best Practice and Research:** clinical rheumatology, v. 15, n. 3, p. 415-427, 2001.
- PASSERTI, M.; PEDRAZZONI, M.; PIOLI, G.; BUTTURINI, L.; RUYS, A. H.; CORTENRAAD, M. G. Effects of nandrolone decanoate on bone mass in estabilished ostoporosis. **Maturitas**, v. 17, p. 211-9, 1993.
- PEDERSON, L.; KREMER, M.; JUDD, J.; PASCOE, D.; SPELSBERG, T. C.; RIGGS, B. L.; OURSLEER, M. J. Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 96, n. 2, p. 505-510, 1999.
- PFEILSCHIFTER, J. DVO: guideline for prevention, diagnosis, and therapy of osteoporosis for women after menopause, for men after age 60: executive summary guidelines. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 114, n. 10, p. 611-622, 2006.
- PIGNOLO, R. J.; KASSEM, M. Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair and regeneration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 8, p. 1685-1693, 2011.
- PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L.; DECAMP, C. E. Brinker, piermattei, flo ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais. 4. ed. Barueri: Manole, 2009. 934 p.

- PIOVESAN, R. F.; FERNANDES, K. P. S.; ALVES, A. N.; TEIXEIRA, V. P.; SILVA JUNIOR, J. A.; MARTINS, M. D.; BUSSADOR, I. S. K.; ALBERTINI, R.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Effect of nandrolone decanoate on skeletal muscle repair. **International Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 1, p. 87-92, 2013.
- POUNTOS, I.; GEORGOULI, T.; PNEUMATICOS, S.; GIANNOUDIS, P. V. Fractures non-union: can biomarkers predict outcome? **Injury**, v. 44, n. 11, p. 1725-1732, 2013.
- RAJASEKERAN, S.; GIANNOUDIS, P. V. Open injuries of the lower extremities: Issues and unknown frontiers. **Injury**, v. 43, n. 11, p. 1783-1784, 2012.
- RAMOSHEB, L. N.; MATSABA, T. N.; TEARE, J.; BARTON, L.; PATTON, J.; RIPAMONTI, U. Tissue Engineering: TGF-β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 4, p. 1-11, 2002.
- RECKER, R. R.; KIMMEL, D. B.; DEMPSTER, D.; WEINSTEIN, R. S.; WRONSKI, T. J.; BURR, D. B. Issues in modern bone histomorphometry. **Bone**, v. 49, n. 5, p. 955-964, 2011.
- REED, A. A. C.; JOYNER, C. J.; ISEFUKU, S.; BROWNLOW, H. C.; SIMPSON A. H. R. W. Vascularity in a new model of atrophic nonunion. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85, n. 4, p. 604-610, 2003.
- RODRIGUEZ-MERCHAN, E. C.; FORRIOL, F. Nonunion: general principles and experimental data. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 419, p. 4-12, 2004.
- SALTER R. B. **Distúrbios e lesões do sistema musculoesquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001. 699 p.
- SALTER, R. B.; HARRIS, W. R. Injuries involving the epiphyseal plate. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 45, n. a, p. 587-593, 1963.
- SCALICZKI, G.; WESZL, M.; SCHANDL, K.; MAJOR, T.; KOVÁCS, M.; SCALICZKI, J.; REDL, H.; SZENDRÓI, M.; SZIGETI, K.; MÁTE, D.; DOBÓ-NAGY, Cs.; LACZA, Zs. Compromised bone healing following space removal in a rat femoral defect model. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 99, n. 2, p. 223-232, 2012.
- SCHILLER, A. L.; TEITELBAUM, S. L. Ossos de articulações. In: RUBIN E.; FARBER J. L. **Patologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2002. p.1288-1363.
- SCHOT, L. P.; SCHUURS, A. H.; KLOOSTERBOER, H. J. The action of anabolic steroids on bone in experimental animals. **Wien Med Wchenschr**, v. 143, n. 14-15, p. 385-7, 1993.
- SCHWABE, P.; SIMON, P.; KRONBACH, Z.; SCHMIDMAIER, G.; WILDEMANN, B. A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue. **International Orthopaedics**, v. 38, n. 12, p. 2623-2629, 2014.
- SHUSTER, S. Osteoporosis, a unitary hypothesis of collagen loss in skin and bone. **Medical Hypotheses**, v. 65, n. 3, p. 426-432, 2005.
- SINNESAEL, M.; CLAESSENS, F.; BOONEN, S.; VANDERSCHUEREN, D. Novel insights in the regulation and mechanism of androgen action on bone. Current **Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 20, n. 3, p. 240-244, 2013.
- SMITH, R. N. The developing skeleton. **Veterinary Radiology**, v. 9, p. 30-36, 1968.

STIFFLER, K. S. Internal fracture fixation. **Clinical Techniques in Small Animal Pratice**, v. 19, n. 3, p. 105-113, 2004.

TENGSTRAND, B.; CEDERHOLM, T.; SÖDERQVIST, A.; TIDERMARK, J. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone on bone tissue after a hip fracture. **Clinical Nutrition**, v. 26, p. 460-465, 2007.

THRALL D. E. **Tratado de diagnóstico radiológico veterinário**. 3. ed. Buenos Aires: Inter-Médica Editorial, 2001. 711 p.

TIDERMARK, J.; PONZER, S.; CARLSSON, P. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone in lean elderly women with femoral neck fratures. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 587-96, 2004.

VANDERSCHUEREN, D.; BOUILLON, R. Androgens and bone. **Calcified Tissues International**, v. 56, n. 5, p. 341-346, 1995.

WEBSTER, D. J.; SCHNEIDER, P.; DALLAS, S. L.; MULLER, R. Studying osteocytes within their environment. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 285-295, 2013.

WELCH, J. A.; BOUDRIEAU, R. J.; DEJARDIN, L. M.; SPODNICK, G. J. The interosseous blood supply of the canine radius: implications for healing of the distal fractures in small dogs. **Veterinary Surgery**, v. 26, n. 1, p. 57-61, 1997.

WYNNYCKY, C.; OMELON, S.; SAVAGE, K.; DAMANI, M.; CHACHRA, D.; GRYNPAN, M. D. A new too to assess the mechanical properties of bone due to collagen degradation. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 840-848, 2009.

XIAODONG, L. I.; TAKAHASHI, M.; KUSHIDA, K.; SHIMIZU, S.; HOSHINO, H.; SUZUKI, M.; INOUE, T. The effcts of nandrolone decanoate on bone mass and metabolism in ovariectomized rats with osteopenia. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 258-263, 2000.

ZAR J. H. Bioestatistical analysis. 4th ed.New Jersey: Prentice Hall, 1998. 929 p.

APÊNDICE A - Valores nutricionais da ração utilizada para alimentação dos ratos.

Nutriente	Valor
Umidade	125g/kg
Proteína bruta	220g/kg
Extrato etéreo	40g/kg
Matéria mineral	90g/kg
Matéria fibrosa	70g/kg
Cálcio	10-14g/kg
Fósforo	8000mg/kg
Vitamina A	13000UI/kg
Vitamina D3	2000UI/kg
Vitamina E	34UI/kg
Vitamina K3	3mg/kg
Vitamina B1	5mg/kg
Vitamina B2	6mg/kg
Vitamina B6	7mg/kg
Vitamina B12	22µg/kg
Niacina	60mg/kg
Ácido pantoênico	20mg/kg
Ácido fólico	1mg/kg
Biotina	0,05mg/kg
Colina	1900mg/kg
Sódio	2700mg/kg
Ferro	50mg/kg
Manganês	60mg/kg
Zinco	12g/kg
Metionina	4000mg/kg
ВНТ	100mg/kg

Fonte: (NUVILAB®, 2012)

APÊNDICE B - Protocolo de técnica colorimétrica para caracterização de tecido ósseo, Hematoxilina-eosina.

Reagente	Exposição
xilol 1	5 minutos
xilol 2	5 minutos
álcool 100%	5 minutos
álcool 90%	5 minutos
álcool 70%	5 minutos
água corrente	10 minutos
hematoxilina de Harris	5 minutos
água corrente	10 minutos
eosina	5 minutos
álcool 90%	5 minutos
álcool 100%	5 minutos
álcool 100%	5 minutos
xilol 1	5 minutos
xilol 2	5 minutos

Fonte: (SENOS, 2014).

APÊNDICE C - Protocolo de técnica colorimétrica para evidenciação de fibras colágenas, Picrosírius modificado.

Reagente	Exposição
xilol 1	5 minutos
xilol 2	5 minutos
álcool 100%	5 minutos
álcool 90%	5 minutos
álcool 70%	5 minutos
água destilada	5 minutos
picrosírius (60°C)	45 minutos
água corrente	5 minutos
hematoxilina Harris	5 minutos
água corrente	5 minutos
álcool 90%	5 minutos
álcool 100%	5 minutos
álcool 100%	5 minutos
xilol 1	5 minutos
xilol 2	5 minutos

Fonte: (SENOS, 2014).

APÊNDICE D - Tabela com valores absolutos das análises de microtomografia computadorizada de osso trabecular do terço médio da cabeça femoral de ratos no grupo controle e tratado com decanoato de nandrolona. Valores por espécime.

	Rato #	Tb.PF	Tb.Th	Tb.N	EN	BV	BV/TV	Conn
Controle	10	15,6593	0,0674	2,7429	-26	0,0583	18,5097	38
	1	15,3464	0,0808	2,0121	-3	0,0740	16,2642	35
	3	10,3542	0,0674	4,2289	-102	0,1298	28,5248	173
	4	16,7848	0,0914	2,2763	-15	0,0948	20,8259	39
au	2	-3,3132	0,0892	4,8441	-68	0,3152	43,2180	99
Nandrolona	6	-1,0682	0,0829	4,6699	-92	0,1762	38,7177	127
ndr	7	-5,0501	0,1432	3,8218	53	0,2492	54,7515	33
Ž	9	-15,2099	0,1102	4,9445	-117	0,2472	54,5117	154

Legenda: GC = grupo controle; CNan = grupo tratado com decanoato de nandrolona; BV = volume ósseo; BV/TV = percentagem de volume ósseo; Tb.Pf = padrão de osso trabecular; Tb.Th = espessura trabecular óssea; Tb.N = número de trabéculas ósseas; Conn = conectividade entre as trabéculas ósseas; EN = número de Euler.

Fonte: (SENOS, 2014).

APÊNDICE E - Tabela com valores absolutos das análises de microtomografia computadorizada de osso cortical do segmento proximal a aproximadamente 3mm proximal do foco não-união de fratura em fêmures de ratos nos grupos controle e tratado com decanoato de nandrolona. Valores por espécime.

	Rato #	BV	BS	B.Ar	B.Pm	Cs.Th	Tb.Th.rd
	10	0,3437	8,3570	1,6757	23,0182	0,1456	0,1444
Controle	1	1,1718	28,2136	5,8441	59,396	0,1677	0,1529
Cont	3	1,1637	24,8377	5,6143	57,3386	0,1958	0,1692
	4	0,6681	13,3518	3,2226	31,2486	0,2062	0,1846
_ er	2	1,5700	29,1911	7,2207	60,2578	0,2397	0,1954
Nandrolona	6	2,3930	44,2327	11,7204	85,8214	0,2731	0,2054
andr	7	6,3068	103,216	30,3317	172,705	0,3512	0,2238
Ž	9	1,75087	31,9613	8,4464	65,6782	0,2572	0,2027

Legenda: BV = volume ósseo; BS = superfície óssea; B.Ar = área óssea; B.Pm = perímetro do osso; Cs.Th = espessura do osso; Tb.Th.rd = espessura de cortical do osso. Fonte: (SENOS, 2014).

APÊNDICE F - Tabela com valores absolutos das análises de microtomografia computadorizada de osso cortical do segmento distal a aproximadamente 3mm distal do foco não-união de fratura em fêmures de ratos dos grupos controle e tratado com decanoato de nandrolona. Valores por espécime.

	Rato#	BV	BS	B.Ar	B.Pm	Cs.Th	Tb.Th.rd
	10	1,4272	32,6590	6,8895	80,313	0,1716	0,15805
role	1	1,2082	28,9902	5,8386	76,1751	0,1532	0,1519
Controle	3	1,7293	36,6138	8,3416	86,1139	0,1937	0,1723
	4	1,4989	33,6599	7,2376	82,7264	0,175	0,1613
а	2	2,1870	62,4904	10,3729	83,4650	0,2663	0,1973
Nandrolona	6	2,4019	45,4822	11,5724	95,9905	0,2411	0,1939
ndr	7	4,4519	81,1569	21,4345	158,533	0,2708	0,1999
Ž	9	1,9611	36,3139	9,4567	73,5341	0,2572	0,1964

Legenda: BV = volume ósseo; BS = superfície óssea; B.Ar = área óssea; B.Pm = perímetro do osso; Cs.Th = espessura do osso; Tb.Th.rd = espessura de cortical do osso. Fonte: (SENOS, 2014).

APÊNDICE G - Tabela com valores absolutos das análises de percentual de colágeno próximo as bordas de fraturas de fêmures não-unidos de ratos em cada um dos cinco campos analisados por espécime numerado (#).

Controle						Nandı	rolona	
	#10 (%)	#1 (%)	#3 (%)	#4 (%)	#2 (%)	#6 (%)	#7 (%)	#9 (%)
	99,03	99,54	91,5	99,34	96,7	97,66	97,67	87,91
nal	93,76	89,23	94,26	99,66	97,5	85,3	98,07	89,05
Proxima	87,93	97,64	89,89	99,23	97,57	77,73	94,95	95,57
Pro	94,51	93,41	89,34	94,14	83,19	92,34	89,74	99,97
	98,08	95,07	94,77	98,93	97,46	97,18	97,6	99,94
	98,62	95,74	98,82	88,16	97,34	99,11	96,11	92,89
-	98,45	84,49	91,4	96,86	97,5	97,94	95,69	92,29
Distal	95,82	90,65	92,55	95,92	98,41	97,43	95,88	99,21
	93,85	99,51	89,67	98,42	97,27	89,13	99,47	99,27
	97,58	97,77	93,64	95,64	95,56	95,37	99,54	95,92