Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho

Locomotor

BRUNA LEONEL CARLOS

**Uso da membrana de látex revestida com β -trifosfato de cálcio
na regeneração guiada de defeito ósseo em tíbia de ratas
osteopênicas**

RIBEIRÃO PRETO

2020

BRUNA LEONEL CARLOS

**Uso da membrana de látex revestida com β -trifosfato de cálcio
na regeneração guiada de defeito ósseo em tíbia de ratas
osteopênicas**

Versão Original

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Coorientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Carlos, Bruna Leonel

Uso da membrana de látex revestida com β -trifosfato de cálcio na regeneração guiada de defeito ósseo em tibia de ratas osteopênicas. Ribeirão Preto, 2020.

120 p.: il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor.

Orientador: Shimano, Antônio Carlos.

1. Osteoporose; 2. Regeneração óssea; 3. Materiais Biocompatíveis; 4. Látex; 5. Trifosfato de cálcio.

Nome: CARLOS, Bruna Leonel

Título: Uso da membrana de látex revestida com β -trifosfato de cálcio na regeneração guiada de defeito ósseo em tíbia de ratas osteopênicas

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus que me acompanha e acompanhou durante toda essa jornada me protegendo e iluminando para não me deixar desanimar frente as dificuldades.

Ao meu pai Sebastião Divino Carlos meu companheiro em todo o caminho que percorri para chegar até aqui. Não importa onde a vida me levar, seus ensinamentos e amor irão sempre comigo.

A minha mãe, Adriana Maria Leonel Carlos por todo seu apoio, carinho e amor incondicional. Tudo o que sou devo a você.

Ao meu noivo, Nestor Vicente Soares Netto, por toda sua paciência, companheirismo e carinho durante essa jornada.

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon por permitir acesso ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa pela cordialidade e competência.

Ao Prof. Dr. Ricardo Tadeu Lopes por permitir acesso aos equipamentos e ao Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Ao Laboratório de Metrologia e ao Laboratório de Pesquisa em Fundição Odontológica do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)/USP e a responsável Prof^a Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza.

Ao Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP/USP e a responsável Prof^a Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e de Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP e a responsável Prof^a. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.

Ao Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP e a responsável Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci.

Ao Laboratório de Proteínas e Histologia do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP/USP e a responsável Prof^a Dra. Raquel Fernanda Gerlach.

Ao Laboratório de Pesquisa Morfológica do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP/USP e ao responsável Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa.

Ao Auxílio Regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2007/20051-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, obrigada por se dedicar ao seu trabalho com tanta verdade e humildade. Seu exemplo de profissionalismo, ética e preocupação com o próximo são fonte de inspiração para mim. Agradeço por todos os ensinamentos, acadêmicos, profissionais e de vida, pois com certeza os levarei para sempre comigo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, agradeço imensamente por toda empatia, dedicação, disponibilidade e valiosas contribuições.

A secretária da Pós-Graduação Rita de Cássia Stela Cossalter pela cordialidade, paciência e competência.

A todos os funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial, Ariane Zamarioli, Maria Teresinha de Moraes e Ismar Ribeiro por toda ajuda e pelo agradável convívio.

Ao técnico de laboratório, Francisco Carlos Mazzocato, agradeço de forma especial. Sua ajuda foi fundamental para que essa pesquisa acontecesse. Obrigada também por toda amizade construída ao longo desses anos.

A técnica de laboratório Viviane de Cássia Oliveira, por toda ajuda para realização nas análises de biologia molecular. Foi uma honra conhecer uma profissional tão dedicada como você, que não mediu esforços para que tudo desse certo. Minha eterna gratidão.

As técnicas de Laboratório da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Nilza Letícia Magalhães e as especialistas de laboratório Junia Ramos e Fabíola Singaretti de Oliveira pelo profissionalismo e assistência, e pela imensa contribuição com todos os ensinamentos.

A Assistente de Suporte Acadêmico Josiane Marcia Maria Canaan da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara/UNESP, pela disponibilidade e ajuda na realização das análises centesimais.

A amiga Ana Clara de Oliveira. Não tenho palavras para agradecer toda a sua ajuda. Obrigada por abrir mão do seu tempo para me ajudar. Obrigada por me acolher em sua casa por tantas vezes. Obrigada por dividir comigo todas as minhas angustias e alegrias. Que continuemos ainda por muitos anos compartilhando nossas experiências, crescendo e aprendendo juntas.

A Dra. Ana Paula Macedo, a qual tenho tanta admiração. Quem dera todos fossem como você, excelente profissional, dedicada e prestativa, sempre buscando maneiras de ajudar o próximo. Obrigada por toda paciência, amparo e amizade. Te conhecer foi um imenso privilégio, estará sempre no meu coração.

A amiga Jéssica Suzuki Yamanaka, agradeço imensamente toda ajuda e companheirismo ao longo desses anos. Você tornou essa jornada bem mais e divertida.

A amiga Roberta Carminati Shimano, obrigada por todo carinho e leveza nas palavras, que tanto me ajudaram nos momentos difíceis.

Ao amigo Guilherme Jafroni, por contribuir para o meu crescimento acadêmico, por toda confiança e amizade.

Aos colegas Aline de Azevedo, Carla, Leonardo, Marcela, Rita, Márcio, Beatriz, Julia, Patrícia, Iara e Suelen, pelo companheirismo e por todos os momentos que compartilhamos na vida acadêmica e pessoal.

Aos meus colegas de trabalho da Universidade do Vale do Sapucaí, por toda amizade, que me ajudaram a chegar até aqui. Agradeço pelas vezes em que se disponibilizaram em ajudar, compreenderam minhas ausências e torceram pelo meu sucesso.

À minha irmã Nara Vanessa Leonel Carlos, que me inspira, com toda sua garra, a ser sempre mais corajosa.

Aos meus familiares, avós, tios, tias, primos e primas, e amigos por todo carinho, torcida e por tudo que representam em minha vida.

E agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*"O sucesso é ir de fracasso em fracasso
sem perder o entusiasmo."*

Winston Churchill

Resumo

RESUMO

CARLOS, B. L. Uso da membrana de látex revestida com β -trifosfato de cálcio na regeneração guiada de defeito ósseo em tíbia de ratas osteopênicas. 2020. 120p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A osteoporose é considerada a doença óssea metabólica mais prevalente no mundo, visto que, diversos fatores são apontados como causas da doença, dentre eles a menopausa e as deficiências nutricionais de vitamina D. O comprometimento da regeneração óssea é uma das complicações associadas à osteoporose, tornando-se um problema de saúde pública global, que gera altos custos de tratamento e prejuízo a qualidade de vida dos pacientes. Para auxiliar na regeneração óssea, as propriedades osteoindutivas de diversos biomateriais têm sido estudadas, como por exemplo, a utilização de membranas de látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. Além de possuir propriedades regenerativas, as membranas de látex podem ser utilizadas para liberação de compostos biológicos no local da lesão, como por exemplo de fosfato de cálcio (CaP). Dentre as fases do CaP o β -trifosfato de cálcio (β -TCP) possui alta biocompatibilidade, boa solubilidade e fácil absorção pela matriz óssea. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar a influência da membrana de látex revestida com β -TCP no reparo tecidual de defeito ósseo realizado em tíbia de ratas submetidas a ovariectomia e dieta com déficit de vitamina D3. Foram utilizadas 50 ratas *Sprague Dawley*. A osteoporose foi induzida por ovariectomia (OVX) e dieta com déficit de vitamina D3 em 40 animais. Nos 10 animais restantes, não foi induzida a osteoporose e os animais passaram pelo procedimento de cirurgia de OVX simulada, sendo utilizados como controles saudáveis. Após 90 dias, um defeito ósseo, de 3mm de diâmetro, foi confeccionado bilateralmente nas tíbias de todos os animais. Os animais osteopenicos foram divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento proposto, sendo: sem tratamento (C), defeito tratado com β -TCP (BTCP), defeito tratado com membrana de látex natural (L), defeito tratado com membrana de látex natural revestido com β -TCP (BTCP+L). Nos animais não osteopenicos os defeitos ósseos não receberam tratamento (SHAM). Após 21 dias,

os animais foram eutanaziados e os ossos foram submetidos as análises de densitometria, micro-CT, ensaio mecânico, histologia e qPCR. Além disso foram dosados os níveis de hormônio folículo estimulante (FSH). Os efeitos da OVX foram confirmados, pois os grupos ovariectomizados apresentaram maiores níveis de FSH ($p < 0,001$). A osteopenia, por sua vez, prejudicou a regeneração óssea, visto que, o grupo C apresentou menor taxa de neoformação óssea ($p = 0,015$), deposição de colágeno ($p = 0,014$), número de trabéculas (Tb.N) ($p = 0,023$), densidade mineral óssea (DMO) ($p < 0,001$) no local do defeito quando comparado ao grupo SHAM. Os grupos tratados não apresentaram diferenças estatísticas entre si, e seus valores foram intermediários para os resultados das análises histológicas, densitométricas e mecânicas. No entanto, em valores absolutos, apresentaram melhores resultados quando comparados ao grupo C. A análise qualitativa das imagens de micro-CT indicaram maior volume de osso recém-formado no grupo SHAM, e nos grupos tratados, porém não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Em conclusão as membranas de látex com β -TCP não influenciaram significativamente a regeneração de defeitos ósseos em tíbias de ratas osteopenicas após 21 dias de tratamento. São necessários mais estudos com maior duração do tratamento e diferentes métodos de revestimento para melhor avaliar os efeitos da membrana na regeneração de ossos osteopenicos.

Palavras-chave: Osteoporose; Regeneração óssea; Materiais Biocompatíveis; Látex; Trifosfato de cálcio.

ABSTRACT

CARLOS, B. L. *Use of latex membrane coated with β -tricalcium phosphate in guided bone regeneration of osteopenic rats.* 2020. 120p. Thesis (PhD degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2020.

Osteoporosis is the most prevalent metabolic bone disease in the world, having several factors as cause, including menopause and nutritional vitamin D deficiency. The impairment of bone regeneration is one of the complications associated with osteoporosis, which generates high treatment costs and affects patients' quality of life. The osteoinductive properties of biomaterials have been studied to assist in bone healing, such as the use of latex membranes extracted from the *Hevea brasiliensis* tree. In addition, recent studies have shown that latex membranes can be used to carry biological compounds to be released at the injury site, such as calcium phosphate (CaP). Among the CaP phases, β -tricalcium phosphate (β -TCP) has high biocompatibility, excellent solubility, and easy absorption by the bone matrix. Therefore, it is suggested that coating latex membranes with β -TCP may improve regeneration because it associates the materials' osteopromotor properties. The aim of this study was to evaluate the effect of a natural latex membrane coated with β -TCP on the repair of bone defects performed in the tibia of rats submitted to ovariectomy and a vitamin D3-deficient diet. Fifty Sprague Dawley rats were used. Osteoporosis was induced by ovariectomy (OVX) and a diet with vitamin D3 deficiency in 40 animals. The remaining 10 animals were submitted to an OVX sham operation, being used as healthy controls. After 90 days, a bone defect of 3 mm in diameter was made bilaterally in the tibias of all animals. The osteopenic animals were divided into four groups: no treatment (C), defect treated with β -TCP (BTCP), defect treated with natural latex membrane (L), and defect treated with natural latex membrane coated with β -TCP (BTCP + L). In healthy control animals, bone defects were not treated (SHAM). After 21 days, the animals were euthanized, and the bones were submitted to densitometry, micro-ct, mechanical assay, histology, and qPCR. In addition, levels of follicle-stimulating hormone (FSH) were measured. The effects of OVX were confirmed, as the ovariectomized groups had higher levels of FSH ($p < 0.001$). Osteopenia impaired bone regeneration, confirmed by the C group showing lower rates of bone

neoformation ($p = 0.015$), collagen deposition ($p = 0.014$), number of trabeculae (Tb.N) ($p = 0.023$), bone mineral density (BMD) ($p < 0.001$), and maximum strength ($p = 0.047$) when compared to the SHAM group. The treated groups had higher values than the C group for histological, densitometry, and mechanical analyzes, however without significant differences. The qualitative analysis of the micro-ct images indicated a greater volume of newly formed bone in the SHAM and treated groups, however also without significant differences. In conclusion, latex membranes with β -TCP did not significantly influence the regeneration of bone defects in the tibias of osteopenic rats after 21 days of treatment. Further studies with longer treatment duration are needed to better assess the method proposed.

Keywords: Osteoporosis; Biomaterial; Bone regeneration; Latex; Tricalcium phosphate.

Listas

Lista de figuras

Figura 1: Síntese do β -TCP pelo método sol-gel.....	58
Figura 2: Produção membrana de látex natural.	59
Figura 3: Membrana de látex natural com suspensão de água e β -TCP.....	60
Figura 4: Procedimento cirúrgico de ovariectomia.	63
Figura 5: Confeção do defeito ósseo.....	65
Figura 6: Medidas de comprimento da tíbia.....	67
Figura 7: Esquema demonstrativo das medidas realizadas para posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo para análise de DMO.	68
Figura 8: Posicionamento do ROI nas imagens de micro-CT.....	69
Figura 9: Posicionamento da tíbia para realização do ensaio mecânico.....	70
Figura 10: Desenhos esquemáticos do posicionamento do osso para confecção blocos histológicos.	71
Figura 11: Esquema de distribuição das lâminas para análises histológicas.	72
Figura 12: Análise histomorfométrica da região do defeito.	72
Figura 13: Análise de densitometria óptica das fibras de colágeno no defeito.	73
Figura 14: Representação da área de corte para realização da análise de qPCR. ...	74
Figura 15: Gráficos da curva de eficiência dos iniciadores correspondentes aos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG) e fator nuclear de (RANKL) e GAPDH.....	75
Figura 16: Massa Corporal dos animais a cada semana de experimento.	79
Figura 17: Gráficos da dosagem do hormônio folículo estimulante - FSH.	80
Figura 18: Gráficos do comprimento das tíbias.	81
Figura 19: Gráficos da massa das tíbias.	81
Figura 20: Gráficos densitometria.	82
Figura 21: Gráficos das propriedades mecânicas ósseas.	83
Figura 22: Imagens Micro-CT.	84
Figura 23: Gráficos dos parâmetros analisados através de micro-CT.....	85
Figura 24: Gráficos dos parâmetros analisados através de micro-CT.....	85
Figura 25: Fotomicrografia da neoformação óssea no defeito. Coloração de Tricomio de Masson em aumento de 50x.	86

Figura 26: Gráfico neoformação óssea expressa pela razão da área de osso (B.Ar - μm^2) pela área total do defeito (Tt.Ar - μm^2), apresentado em %.	87
Figura 27: Gráfico das fibras de colágeno no defeito expressa pela razão da área de colágeno (Col.Ar - μm^2) pela área total do defeito (Tt.Ar - μm^2), apresentado em %.	88
Figura 28: Gráficos da expressão relativa dos genes OC e MMP-9.	88
Figura 29: Gráficos da expressão relativa dos genes OPG e RANKL.	89

Lista de tabelas

Tabela 1: Características das fases de CaP utilizadas em aplicações biomédicas. .50	50
Tabela 2: Características do látex natural.59	59
Tabela 3: Grupos experimentais.61	61
Tabela 4: Composição centesimal ração com déficit de vitamina D.62	62
Tabela 5: Análises e protocolos de armazenamento das tíbias.66	66
Tabela 6: Número de amostras para análise de FSH e distribuição das tíbias direitas de acordo com as análises e grupos experimentais.....78	78
Tabela 7: Distribuição das tíbias esquerdas de acordo com as análises e grupos experimentais.79	79
Tabela 8: Peso corporal semanal 118	118
Tabela 9: Diferenças estatísticas peso corporal semanal. 118	118
Tabela 10: Resultados FSH. 119	119
Tabela 11: Resultados para análise macroscópica das tíbias. 119	119
Tabela 12: Resultados densitometria óssea. 119	119
Tabela 13: Resultados ensaio mecânico. 119	119
Tabela 14: Resultados micro-Ct para os valores de BV/TV e Tb.Th..... 120	120
Tabela 15: Resultados micro-Ct para os valores de Tb.N e Tb.Sp. 120	120
Tabela 16: Resultados histologia. 120	120
Tabela 17: Resultados qPCR..... 120	120

Lista de Quadros

Quadro 1: Sequência dos pares de iniciadores utilizados no experimento . 76

Lista de siglas e abreviações

ACP	Fosfato de Cálcio Amorfo
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BTCP	Grupo experimental β -trifosfato de cálcio
BTCP+L	Grupo experimental β -trifosfato de cálcio + látex
BV/TV	Fração de volume ósseo pelo volume total
C	Grupo experimental controle
Ca	Cálcio
CaP	Fosfato de cálcio
cDNA	DNA complementar
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DCPA	Difosfato de Cálcio Anidro
DCPD	Difosfato de Cálcio Desidratado
DEPC	Dietilpirocarbonato livre
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
d-PTFE	Politetrafluoretileno denso
EDTA	Ácido etilenodiamínico tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FEFAR	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase
HAp	Hidroxiapatita
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
K	Potásio
L	Látex

LIN	Laboratório de Instrumentação Nuclear
MCPM	Fosfato de Cálcio Monobásico Hidratado
M-CSF	Fator Estimulador da Colônia de Macrófagos
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
MMP	Metaloproteinase
OC	Osteocalcina
OCP	Octofosfato de Cálcio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteopogerina
OPN	Osteopontina
OVX	Ovariectomia
P	Fósforo
PTH	Paratormônio
RANK	Fator Nuclear Kappa Beta
RANKL	Ligante do Fator Nuclear Kappa Beta
ROG	Regeneração Óssea Guiada
ROI	Região de Interesse do Objeto
SHAM	Grupo experimental cirurgia simulada
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular
TCP	Trifosfato de Cálcio
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTCP	Tetrafosfato de Cálcio
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VDR	Receptor Nuclear de Calcitriol
VDRE	Receptor de Resposta ao Calcitriol no DNA
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
α -TCP	Alfa Trifosfato de Cálcio
β -TCP	Beta Trifosfato de Cálcio

Lista de símbolos

%	porcentagem
-	negativo
+	positivo
±	mais ou menos
x	vezes
<	menor
=	igual
>	maior
β	beta
α	alfa
Δ	delta
®	marca registrada
°	grau
°C	grau Celsius
μA	microampere
μm	micrometro
μm ²	micrometro quadrado
μL	microlitro
cm	centímetro
3D	três dimensões
g	grama
kg	quilograma
kV	quilovolt
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mm/min	milímetro por minuto
mol	molar

n ^o	número
N	Newton
s	segundo

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	34
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	37
2.1. Osso..	37
2.2. Remodelação óssea	38
2.2.1. Cargas mecânicas na remodelação óssea	39
2.2.2. Calcitonina e Paratormônio na remodelação óssea.....	39
2.2.3. Vitamina D na remodelação óssea	40
2.2.4. Estrogênio na remodelação óssea.....	40
2.1. Regeneração óssea.....	41
2.2. Osteoporose	43
2.2.1. Regeneração óssea em ossos osteoporóticos	44
2.3. Regeneração óssea guiada	45
2.4. Látex natural	46
2.5. Fosfato de Cálcio e suas aplicações biomédicas.....	48
2.5.1. Beta – Trifosfafo de cálcio	50
3. HIPÓTESE.....	53
4. OBJETIVOS	55
4.1. Objetivo geral.....	55
4.2. Objetivos específicos.....	55
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
5.1. Ética experimental.....	57
5.2. Obtenção do β-TCP	57
5.3. Produção das membranas.....	58
5.3.1. Membrana de látex	58
5.3.2. Membrana de látex revestida com β -TCP.....	59
5.4. Animais experimentais	60

5.5. Delineamento experimental	61
5.6. Métodos para indução da osteopenia	61
5.6.1. Dieta	61
5.6.2. Ovariectomia	62
5.7. Defeito ósseo	64
5.8. Eutanásia e preparo dos materiais para análises	65
5.9. Análise do hormônio folículo estimulante.....	66
5.10. Análise macroscópica dos ossos	66
5.11. Densitometria	67
5.12. Microtomografia computadorizada	68
5.13. Ensaio mecânico.....	69
5.14. Histologia.....	70
5.14.1. Histomorfometria do osso.....	72
5.14.2. Histomorfometria do colágeno.....	73
5.15. PCR em tempo real	73
5.15.1. Extração de RNA.....	74
5.15.2. Síntese do cDNA.....	74
5.15.3. Teste de eficiência dos iniciadores.....	75
5.15.4. qPCR.....	75
5.16. Análise estatística.....	76
6. RESULTADOS.....	78
6.1. Análise experimental	78
6.2. Peso corporal.....	79
6.3. Hormônio Folículo Estimulante	80
6.4. Análise macroscópica dos ossos	80
6.4.1. Comprimento ósseo	81
6.4.2. Massa óssea	81

6.5. Densitometria.....	82
6.6. Ensaio mecânico	82
6.7. Micro-CT.....	83
6.7.1. Análise qualitativa	83
6.7.2. Análise quantitativa.....	84
6.8. Histologia	86
6.8.1. Tecido ósseo neoformado	86
6.8.2. Colágeno	87
6.9. qPCR.....	88
7. DISCUSSÃO	91
8. CONCLUSÕES	103
9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
REFERÊNCIAS	106

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os ossos demonstram uma notável capacidade de reparação tecidual, sendo capazes de reestabelecer suas características fisiológicas e biomecânicas após fraturas (BUZA; EINHORN, 2016). No entanto, em aproximadamente 2 a 15% dos casos, podem ocorrer falhas nos processos biológicos essenciais para recuperação do tecido ósseo, gerando retardos ou ausência de regeneração do osso (CHEUNG et al., 2016; MILLS; AITKEN; SIMPSON, 2017; RUPP et al., 2018; SCHLICKWEI et al., 2019).

As causas de falhas no processo regenerativo são complexas e múltiplas, incluindo, grandes defeitos ósseos resultantes de cirurgias ou traumas, instabilidades mecânicas, prejuízos no suprimento sanguíneo, idade avançada, deficiências nutricionais, e doenças osteometabólicas, como a osteoporose (ANDRZEJOWSKI; GIANNOUDIS, 2019; SANTOLINI; WEST, 2015).

A osteoporose é reconhecida como a desordem óssea mais prevalente no mundo, que se caracteriza por fragilidade esquelética e consequente aumento da suscetibilidade a fraturas (BLACK; ROSEN, 2016; COUGHLAN; DOCKERY, 2014). Diversos fatores são apontados como causas da osteoporose, dentre eles, se destacam o avanço da idade, a menopausa e os baixos níveis de vitamina D séricos (SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017).

O manejo de fraturas osteoporóticas por sua vez, é difícil, devido às deficiências regenerativas do tecido e a pobre qualidade óssea, que podem levar a instabilidades e fixações inadequadas (DEREKA et al., 2018; HAK, 2018). A complexidade no tratamento de lesões ósseas nessa população, são fatores responsáveis por elevar as taxas de morbidade e mortalidade, bem como, aumentar os custos em saúde. Logo a necessidade clínica de reverter a perda óssea, bem como, estimular a formação e regeneração óssea está aumentando e se tornou um desafio para a ciência (RUSSOW et al., 2019).

Para auxiliar na regeneração do tecido ósseo, as propriedades osteoindutivas de diversos biomateriais têm sido estudadas, como por exemplo, a utilização de membranas a base de látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. Esse composto tem a capacidade de induzir a neovascularização, adesão celular e

formação de matriz extracelular, auxiliando na regeneração de diversos tecidos (BORGES et al., 2015; CARLOS et al., 2019; ZANCANELA et al., 2019).

Nos ossos, as membranas de látex são utilizadas na técnica de regeneração óssea guiada (ROG), atuando dessa forma como barreira protetora no local da lesão que previne a invasão de células não osteogênicas. Além disso, protege o coágulo sanguíneo e promove a proliferação local de células osteoprogenitoras, induzindo a formação de tecido ósseo (CARLOS et al., 2019; ELGALI et al., 2017; ERENO et al., 2010; OMAR et al., 2019).

Além de possuir propriedades regenerativas, estudos recentes têm mostrado que membranas de látex podem ser utilizadas para liberação de compostos biológicos (BORGES et al., 2015; HERCULANO et al., 2009; MIRANDA et al., 2018; ZANCANELA et al., 2019). Borges et al. (2015), pensando na utilização de membranas de látex para regeneração óssea, revestiram as membranas com fosfato de cálcio (CaP). O CaP é um biomaterial com propriedades osteoindutoras que auxiliam a proliferação óssea.

O Beta-trifosfato de cálcio (β -TCP) é uma fase do CaP com alta biocompatibilidade, boa solubilidade e fácil absorção pela matriz óssea. No entanto, assim como a maioria das cerâmicas de CaP apresenta baixa resistência mecânica, além disso, possui baixa biodegradação devido à sua alta estabilidade e se dispersa para a área de tecidos moles (ELIAZ; METOKI, 2017; SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013).

A possibilidade de recobrir membranas de látex com β -TCP é uma nova alternativa para auxiliar a regeneração óssea em ossos osteoporóticos, pois dessa forma é possível associar as propriedades osteopromotoras do látex e CaP. Apesar dos avanços nas pesquisas sobre a capacidade de revestir membranas de látex com CaP (BORGES et al., 2015), a utilização desta nova proposta de biomaterial ainda não foi testada *in vivo*.

Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da membrana de látex revestida com β -TCP no reparo tecidual de defeito ósseo realizado em tíbia de ratas osteopênicas.

Referencial teórico

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1.Osso

Os ossos são estruturas rijas e de cor esbranquiçada, que em conjunto formam a estrutura esquelética. O esqueleto proporciona sustentação ao corpo, além de ser essencial para a motricidade, pois funciona como um sistema de alavancas, que juntamente com o sistema articular e muscular, permitem o movimento. Além disso, os ossos protegem órgãos vitais, participam da hematopoese e armazenam íons cálcio (Ca) e fosfato (PO_4^{3-}), participando da homeostase mineral (ELIAZ; METOKI, 2017).

O tecido ósseo é extremamente especializado e dinâmico, composto por matriz orgânica (30-35%) e inorgânica (65-70%). A porção inorgânica consiste basicamente de cristais de hidroxiapatita (HAp), que conferem rigidez ao osso, enquanto que, a porção orgânica é representada por proteoglicanos, proteínas colágenas, e proteínas não colágenas. Além disso, compõem o tecido ósseo as células ósseas, sendo elas os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Macroscopicamente o tecido ósseo se organiza em osso cortical, também chamado compacto, e osso trabecular, também denominado esponjoso. O osso cortical forma a camada externa dos ossos, variando sua espessura nos diferentes ossos do esqueleto. A principal característica do osso cortical é a ausência de cavidades, com poros da ordem de aproximadamente 6%, sendo bastante denso (ELIAZ; METOKI, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O osso trabecular, por sua vez, é encontrado no interior dos ossos, mais especificamente nas epífises e metáfises dos ossos longos e nos corpos vertebrais. Essa conformação óssea é altamente porosa, com poros da ordem de 80%. A espessura média das trabéculas é de cerca de 50 a 300 μm , com uma orientação que depende da distribuição de carga no osso (ELIAZ; METOKI, 2017). A presença de osso trabecular é importante, pois sua arquitetura é organizada para otimizar a transferência e suporte de cargas (OFTADEH et al., 2015).

A remodelação óssea é o processo de renovação tecidual que acontece nos ossos, a fim de manter a integridade estrutural do osso, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas, como por exemplo nos casos de fraturas ou defeitos ósseos.

2.2. Remodelação óssea

Para manter sua integridade estrutural, o tecido ósseo está em constante processo de renovação, adaptando sua estrutura a exigências mecânicas e biológicas. Esse processo é essencial para o reparo de ossos danificados devido às imposições de cargas mecânicas diárias, bem como para o controle do equilíbrio mineral sistêmico e prevenção dos efeitos do envelhecimento no osso (KENKRE; BASSETT, 2018; RUSSOW et al., 2019; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

A remodelação óssea é um processo complexo, ordenado por células, em um ciclo de duas fases principais: reabsorção e formação óssea. Para a manutenção da homeostase do metabolismo ósseo é necessário o equilíbrio entre formação e reabsorção (ALMEIDA et al., 2017; FLORENCIO-SILVA et al., 2015; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

O processo de síntese da matriz óssea é mediado por osteoblastos. A diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos é induzida pela ativação de fatores de transcrição específicos (RUSSOW et al., 2019). A síntese de matriz óssea pelos osteoblastos ocorre em duas etapas: inicialmente há a deposição de matriz orgânica, composta principalmente por colágeno tipo I e proteínas não colágenas, como osteopontina (OPN) e osteocalcina (OC). Em seguida a matriz orgânica é mineralizada. Ao final da síntese do tecido ósseo, os osteoblastos, envolvidos por matriz calcificada, sofrem apoptose ou diferenciam-se em osteócitos ou células de revestimento (KATSIMBRI, 2017).

A reabsorção óssea, por sua vez, é mediada pelos osteoclastos, que são células multinucleadas originadas de macrófagos. A ligação entre o receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANK) e seu ligante (RANKL), bem como a secreção do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) induzem a diferenciação da linhagem osteoclástica, através do recrutamento de macrófagos que se fundem dando origem aos osteoclastos multinucleados, que se ligam à superfície óssea e iniciam a reabsorção (RUSSOW et al., 2019). Em contrapartida, a diferenciação de osteoclastos é inibida pela ação da osteoprotegerina (OPG), molécula proteica, sintetizada por

osteoblastos que se liga ao receptor RANKL, impedindo sua ação. Sendo assim, a relação OPG/RANKL é um indicador importante de atividade osteoclástica e de reabsorção óssea (KATSIMBRI, 2017; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

Fisiologicamente, o processo de remodelação óssea é regulado por estímulos bioquímicos locais e sistêmicos (hormônios e fatores de crescimento), bem como por fatores mecânicos. As cargas mecânicas aplicadas sobre o osso desempenham função primordial na manutenção do tecido ósseo, pois os sinais mecânicos são transformados em sinais biológicos que estimulam a osteogênese (ELIAZ; METOKI, 2017; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). Já os fatores biológicos relacionados ao metabolismo ósseo, envolvem complexas interações entre hormônios, fatores de crescimento e seus receptores (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

Calcitonina, paratormônio (PTH), vitamina D3 e estrogênio são os principais hormônios reguladores da remodelação óssea, atuando na regulação da remodelação através do controle da osteoblastogênese, osteoclastogênese, controle dos níveis plasmáticos de Ca e fósforo (P), dentre outros (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

2.2.1. Cargas mecânicas na remodelação óssea

As cargas mecânicas são reconhecidas pelos osteócitos, que induzem alterações bioquímicas levando a inibição da apoptose de osteoblastos, aumento da proliferação celular, dentre outros efeitos que auxiliam a osteogênese. Esse processo é denominado mecanotransdução (NISHIDA; KUBOTA; TAKIGAWA, 2017).

Além da mecanotransdução, outro efeito importante é a piezoelectricidade. Neste, as forças externas, que geram mínimas deformações sobre o tecido ósseo, levam a ativação de canais iônicos mecanossensíveis de Ca e potássio (K), gerando potenciais de membrana, que são negativos (hiperpolarização) em áreas de compressão e positivos (despolarização) nos locais de tração. A hiperpolarização está associada a formação óssea, enquanto que a despolarização, com a reabsorção óssea (ROSA et al., 2015).

2.2.2. Calcitonina e Paratormônio na remodelação óssea

A Calcitonina e PTH são hormônios que controlam os níveis plasmáticos de Ca. A calcitonina, é secretada por células C da tireoide quando os níveis plasmáticos de Ca estão acima do normal, inibindo o efluxo de Ca do osso. Esse hormônio suprime

a reabsorção óssea através da inibição da atividade dos osteoclastos e aumento da proliferação de osteoblastos (NAOT; MUSSON; CORNISH, 2019).

O PTH, por sua vez, é sintetizado e secretado pelas glândulas paratireoides, quando há deficiência dos níveis de Ca no plasma. Esse hormônio estimula indiretamente a atividade de osteoclastos, através do aumento de liberação RANKL e diminuição da liberação de OPG pelos osteoblastos (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

2.2.3. Vitamina D na remodelação óssea

A vitamina D, mais especificamente o calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), que é a forma hormonal ativa da vitamina D, desempenha papel fundamental na homeostase do osso. Esse hormônio aumenta a captação intestinal dos íons Ca e PO_4^{3-} , minimiza a perda renal de Ca e estimula a remodelação óssea quando necessário, através da osteoblastogênese (LIPS, 2006).

A vitamina D ocorre sob duas formas, o ergocalciferol ou vitamina D2 e o colecalciferol ou vitamina D3. Ambas as formas podem ser sintetizadas na camada da pele após exposição à luz ultravioleta. Além disso também podem ser obtidas através da alimentação, sendo o colecalciferol a principal fonte alimentar de vitamina D. A ingestão de vitamina D através da dieta é importante para atingir o nível sérico ideal (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2015).

Na célula, o calcitriol age ligando-se ao receptor nuclear (VDR) e essa ligação interage com o elemento de resposta à vitamina D no DNA (VDRE). Essa interação resulta em transcrição de genes para várias proteínas, por exemplo OC e fosfatase alcalina nos osteoblastos e calbindin (responsável pelo aumento da captação de Ca no intestino) no intestino. Alguns fatores podem interferir na eficiência da vitamina D, como por exemplo a diminuição dos níveis de estrogênio, pois esse hormônio tem atividade indutora da síntese de VDR. Um outro fator é o envelhecimento, pois com o aumento da idade há diminuição de VDR intestinal (BARRAL; BARROS; ARAÚJO, 2007).

2.2.4. Estrogênio na remodelação óssea

O estrogênio é um hormônio, produzido pelos ovários, que tem importante função no metabolismo ósseo. Sua função é complexa, mas entende-se que o estrogênio participa no controle da vida útil das células ósseas, causando apoptose de células progenitoras de osteoclastos, inibindo a apoptose osteoblástica e

osteocitária, bem como, prevenindo a reabsorção óssea excessiva (KATSIMBRI, 2017; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016; XIAO et al., 2016).

Os receptores ósseos de estrogênio são expressos por osteoclastos e osteoblastos. O estrogênio inibe a fusão e diferenciação de macrófagos precursores de osteoclastos, através da redução plasmática de interleucina 1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF- α), que são citocinas que estimulam a secreção de Interleucina 6 (IL-6) e M-CSF (TANG; LANE, 2012). A formação de osteoclastos também é reduzida pois o estrogênio inibe a síntese de RANKL por osteoblastos e osteócitos e aumenta a produção de OPG (KATSIMBRI, 2017).

Nos osteoblastos, o estrogênio age induzindo a síntese de colágeno e promovendo a liberação de fatores como o Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) que atua sobre os osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea e estimulando a apoptose dessas células.

A deficiência de estrogênio na menopausa leva ao aumento na formação e na sobrevivência dos osteoclastos, com consequente aumento da reabsorção óssea. A diminuição dos níveis de estrogênio é um fator que tem importante impacto para o desenvolvimento da osteoporose (ALMEIDA et al., 2017).

2.1. Regeneração óssea

A regeneração óssea é um complexo processo biológico que acontece para reestabelecer a estrutura dos ossos após uma fratura ou após a confecção de defeitos, resultantes de traumas ou cirurgias. Esse processo é mediado por eventos biológicos e mecânicos que, ao final, resultam na reparação tecidual sem a formação de uma cicatriz fibrosa, recuperando as características fisiológicas e mecânicas do tecido ósseo (BUZA; EINHORN, 2016).

No geral, a regeneração óssea envolve uma sequência ordenada de eventos biológicos, sendo inflamação, proliferação de células osteoprogenitoras, formação de tecido cartilaginoso, mineralização e remodelação (EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

Inicialmente o rompimento de vasos sanguíneos causado pelo trauma associado a fratura gera hipóxia local, que dá início a inflamação. Nessa fase, diversos sinalizadores biológicos são liberados, incluindo TNF- α , TGF- β , proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e interleucinas. Essa etapa inicial é fundamental para

iniciar o reparo tecidual, pois estimula a angiogênese, atrai e promove a diferenciação celular e aumenta a síntese de matriz extracelular (LIU et al., 2018).

Uma rede de suplemento sanguíneo no local da fratura é extremamente importante para regeneração óssea, visto que, irá reestabelecer a oxigenação local, além de fluxo para migração de células osteoprogenitoras ao local da lesão, como por exemplo migração de macrófagos e células tronco mesenquimais. A formação de novos vasos sanguíneos é estimulada pela expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) por macrófagos, que foram atraídos pela hipóxia inicial. Proteínas morfogenéticas vasculares também são importantes nesse processo, pois promovem crescimento vascular inicial, a partir de vasos existentes no periósteo (TERHEYDEN et al., 2012).

Ainda, no período inicial, após a lesão, ocorre a formação de um coágulo no local da fratura, que irá proporcionar um suporte temporário para a diferenciação de células-tronco em tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo (GHIASI et al., 2017). Gradualmente, durante o processo de regeneração óssea, o coágulo vai sendo substituído por tecido cartilaginoso. Essa estrutura, característica dos processos de formação óssea indireta, será mineralizado, formando um calo ósseo que em seguida será absorvido e substituído por tecido ósseo organizado ao final da regeneração. (GHIASI et al., 2017; MARSELL; EINHORN, 2011). As Metaloproteinases (MMPs) são necessárias para a remodelação adequada da matriz durante a cicatrização óssea, principalmente MMP2 e MMP9 pois tem como função a degradação do colágeno desnaturado. Além disso estudos apontam que as MMPs podem atuar como biomarcadores da regeneração óssea.

As influências mecânicas na regeneração, estão intimamente relacionadas ao movimento entre as extremidades ósseas em uma fratura ou defeito. O movimento moderado entre os fragmentos ósseos leva à regeneração óssea endocondral, caracterizada pela formação inicial de um calo ósseo cartilaginoso, enquanto que, mínima quantidade de movimento entre os fragmentos resulta em regeneração óssea intramembranosa, com formação óssea direta, a partir da conversão de tecido mesenquimal em osso.

Apesar da notável capacidade do osso para reparar danos a sua estrutura, em cerca de 10% dos casos, esse processo pode ser prejudicado, gerando atrasos ou falhas na regeneração. São fatores apontados como prejudiciais para a regeneração óssea: grandes defeitos ósseos resultantes de cirurgias ou traumas,

prejuízos no suprimento sanguíneo, presença de tecidos não osteogênicos competitivos no local da lesão, instabilidades mecânicas, além de fatores dependentes do paciente, como idade, hábitos de vida e doenças ósseo metabólicas, como por exemplo a osteoporose (ANDRZEJOWSKI; GIANNOUDIS, 2019; BUZA; EINHORN, 2016; RUSSOW et al., 2019).

2.2. Osteoporose

A osteoporose é um distúrbio do metabolismo ósseo que gera aumento da fragilidade esquelética, em consequência a diminuição da massa óssea, tornando os ossos mais propensos a fraturas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o diagnóstico da osteoporose pode ser realizado a partir da avaliação da densidade mineral óssea (DMO) que é medida pelo exame de densitometria por dupla emissão de raios-x, sendo que, valores de T-score menor que -2,5 caracterizam quadro clínico de osteoporose. No entanto, a presença de fratura de baixo trauma, definida como fratura resultante de trauma igual ou menor a queda da própria altura, também é indicativo de osteoporose, visto que, estas podem acontecer em indivíduos com valores de T-score maiores do que os definidos pela OMS (ARMAS; RECKER, 2012; BLACK; ROSEN, 2016).

Outros fatores também são apontados como responsáveis pelo aumento da fragilidade de ossos osteoporóticos, sendo eles a deterioração da microarquitetura do osso, o reparo insuficiente de pequenos danos gerados por cargas mecânicas, a pobre qualidade dos componentes teciduais do osso e a remodelação óssea excessiva (ARMAS; RECKER, 2012; SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017).

Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas tenham problemas com a osteoporose, sendo mais incidente em mulheres brancas no período pós-menopausa. Nos Estados Unidos da América (EUA) 11% dos idosos apresentam quadro de osteoporose, sendo que, em mulheres no período pós menopausa esse valor sobe para 15,4% em mulheres com mais de 50 anos e 34,9% em mulheres com mais de 80 anos (LOOKER et al., 2017; WRIGHT et al., 2014). No Brasil, a prevalência relatada de osteoporose em mulheres na pós-menopausa varia de 15% a 33% (BACCARO et al., 2015; SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017).

Uma das principais causas relacionadas a osteoporose é a menopausa. O desequilíbrio na remodelação óssea em mulheres após esse período, está fortemente

ligado aos déficits nos níveis de estrogênio (BLACK; ROSEN, 2016). A ação desse hormônio no metabolismo ósseo é complexa, sabe-se que, a redução na produção e secreção de estrogênio leva a aumento da taxa de reabsorção óssea, que excedem a formação, reduzindo a massa óssea. Esse desequilíbrio pode estar relacionado a diversas alterações fisiopatológicas, como redução da diferenciação de células da linhagem osteoblástica e aumento da diferenciação e atividade de células da linhagem osteoclástica. Ainda, seu déficit diminui a absorção intestinal de Ca e o número de receptores para vitamina D (KARLAMANGLA; BURNETT-BOWIE; CRANDALL, 2018; KATSIMBRI, 2017; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

Outros diversos fatores são apontados como fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose, como por exemplo: aumento da idade, insuficiência de vitamina D, baixa ingestão de cálcio, tabagismo, abuso de álcool, sedentarismo, imobilização, baixa exposição solar, uso de medicamentos como corticosteroides, dentre outros (SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017).

Um dos maiores problemas consequentes da osteoporose, são as fraturas. Em todo o mundo, 1 em cada 3 mulheres após os 50 anos e 1 em cada 5 homens terão fraturas osteoporóticas durante a vida (SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017). Por ano mais de 9 milhões de fraturas osteoporóticas são relatadas em todo o mundo (JOHNELL; KANIS, 2006). As fraturas, resultantes da osteoporose, acarretam em sérios prejuízos físicos e psicológicos aos pacientes, bem como aumento nos gastos em saúde com medicamentos, internações, cirurgias e reabilitação (BLACK; ROSEN, 2016). Ainda, essas fraturas aumentam expressivamente as taxas de mortalidade, que podem exceder os 20% no primeiro ano após a fratura (MARINHO et al., 2014).

As fraturas osteoporóticas podem ser acompanhadas por dor, deformidades ósseas, medo, angústia, dificuldade em realizar atividades de vida diárias, perda de independência e institucionalização (MARINHO et al., 2014).

Além disso, as perturbações moleculares que levam à osteoporose também estão associadas ao atraso na cicatrização das fraturas e à regeneração óssea prejudicada (RUSSOW et al., 2019).

2.2.1. Regeneração óssea em ossos osteoporóticos

Os ossos possuem boa capacidade de regeneração frente a lesões, porém, diversos fatores podem prejudicar esse processo, tais como doenças ósseo metabólicas como a osteoporose (ANDRZEJOWSKI; GIANNOUDIS, 2019).

No contexto de atraso ou de não união ósseas, as fraturas em indivíduos com osteoporose acarretam em morbidade significativa do paciente e aumento dos gastos em saúde (SANGHANI-KERAI et al., 2018).

Múltiplos mecanismos são apontados como prejudiciais à cicatrização de fraturas em pacientes osteoporóticos. A remodelação óssea desequilibrada leva à microarquitetura óssea prejudicada devido ao número e atividade de osteoblastos reduzidos e, como tal, a formação do calo ósseo é diminuída (SANGHANI-KERAI et al., 2018). Além disso pode haver alterações nos processos relacionados ao recrutamento, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras; vascularização no local, e diminuição da sensibilidade dos osteoblastos aos sinais mecânicos (CHEUNG et al., 2016; HAK, 2018).

Por isso, estratégias para auxiliar na regeneração tanto de fraturas, quanto de defeitos ósseos, têm sido cada vez mais estudadas em populações com osteoporose.

2.3. Regeneração óssea guiada

A ROG é uma técnica empregada a quase 30 anos, para otimizar a formação óssea. Nesta técnica, uma membrana biocompatível é posicionada sobre o local da lesão, funcionando como barreira física que impede que células não osteogênicas de rápida proliferação, como por exemplo, células do tecido epitelial e conjuntivo, invadam o local, proporcionando assim, ambiente propício para proliferação de células osteogênicas no defeito ósseo (ELGALI et al., 2017).

As membranas também protegem o coágulo sanguíneo, importante estrutura para regeneração óssea. Além disso, diminui a presença de células osteoclásticas, que são originárias de vasos sanguíneos dos tecidos moles ao redor da lesão, permitindo que a neoformação óssea seja otimizada no estágios iniciais após a lesão (GRUBER; STADLINGER; TERHEYDEN, 2016; OMAR et al., 2019).

Uma variedade de materiais sintéticos ou de origem natural, absorvíveis e não absorvíveis, tem sido usada clinicamente como membranas na ROG. Após anos de pesquisas foram definidos requisitos básicos para a utilização de membranas na ROG, sendo eles: ser biocompatível; possuir permeabilidade, mas não permitir a passagem de células; funcionar como suporte físico ao tecido mole circundante; proteger o coágulo sanguíneo; proteger a rede vascular e excluir células não osteogênicas. A biocompatibilidade refere-se a propriedade do material de interagir

com o tecido sem afetar adversamente os tecidos circundantes, o resultado de cicatrização pretendido ou a segurança do paciente (ELGALI et al., 2017; OMAR et al., 2019; RETZEPI; DONOS, 2010; TURRI et al., 2016).

Nos últimos anos foram estudadas estratégias para incorporar substâncias biológicas, células e agentes antibacterianos, na membrana ou no defeito. A membrana, pode ser modificada de diferentes formas, que incluem: (1) otimizar suas propriedades físico-químicas e mecânicas, alterando sua porosidade, estrutura, espessura, rigidez ou plasticidade; (2) incorporar fatores biológicos à membrana, tais como, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e BMPs; (3) incorporar materiais bioativos sintéticos à membrana, como por exemplo, HA e β -TCP; (4) incorporar agentes antibacterianos e antibióticos à membrana. Além disso, os defeitos ósseos podem ser preenchidos com materiais osteocondutores e osteoindutores, a fim de estimular um ambiente de promoção óssea durante a ROG (BORGES et al., 2015; JO et al., 2015; LEE et al., 2015; OMAR et al., 2019).

2.4. Látex natural

O látex natural é um polímero composto por aproximadamente 50% de água, 4-5% de proteínas, lipídeos e carboidratos e 30-45% de hidrocarboneto cis-1,4-poliisopreno (borracha), sendo amplamente utilizado em diversas aplicações na indústria. Além disso, o látex também tem sido apontado como biomaterial com capacidade de auxiliar na regeneração tecidual (BORGES, 2015; ZANCANELA et al., 2019).

O látex natural é extraído da seringueira *Hevea Brasiliensis*, através de uma incisão na casca da árvore e ao ser coletado, apresenta-se na forma líquida com aspecto leitoso e de coloração esbranquiçada. As tribos indígenas da Amazônia utilizavam o látex em seu estado natural para cura de feridas na pele (MORAES et al., 2012; ROSA et al., 2019). Os estudos sobre as propriedades regenerativas desse material, no entanto, iniciaram-se em 1994, pelo professor Joaquim Coutinho Netto (*in memoriam*), então professor do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Desde então, pesquisadores tem estudado as características bioquímicas que conferem ao biomaterial a capacidade de influenciar processos cicatriciais em diferentes tecidos (MORAES et al., 2012; MRUE et al., 2004), como por exemplo pele (FRADE et al.,

2012; ROSA et al., 2019), tímpano (SOUZA et al., 2007), conjuntiva ocular (PINHO et al., 2004) e osso (CARLOS et al., 2019; ERENO et al., 2010).

Diversos estudos demonstraram que as membranas a base de látex têm a capacidade de induzir a neovascularização, essencial para regeneração tecidual, pois permite melhor oxigenação, transporte de células inflamatórias e regenerativas ao local da lesão (ANDRADE et al., 2011; FERREIRA et al., 2009). A pesquisa realizada por Ferreira et al. (2009) avaliou a influência do látex na atividade neoangiogênica em modelo de membrana corialantóide de embrião de galinha e observaram aumento dos vasos sanguíneos após a utilização do látex.

Em estudo realizado por Frade et al. (2004) as membranas de látex foram utilizadas para o manejo de úlceras cutâneas em pacientes diabéticos. Clinicamente, foi observado formação de tecido de granulação com diminuição do sintoma de dor. A nível histopatológico foi observada diferenciação do tecido cicatricial e áreas de neoangiogênese com aumento de fatores de crescimento como VEGF e TGF- β , demonstrando as propriedades de induzir a cicatrização tecidual.

A utilização de membranas de látex na regeneração óssea, através da ROG, tem mostrado resultados promissores, visto que, as membranas possuem características favoráveis à regeneração óssea, sendo elas: elasticidade, flexibilidade, alta resistência mecânica, biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de auxiliar a neoangiogênese (CARLOS et al., 2019; ERENO et al., 2010).

Ereno et al. (2010) utilizaram a membrana de látex na ROG em defeitos realizados na calvária de coelhos e Carlos et al. (2019) na ROG em defeitos realizados em tíbia de ratos. Ambos trabalhos não observaram sinais de alergia, processo inflamatório crônico ou rejeição a membrana, bem como as análises qualitativas e quantitativas de neoformação óssea sugerem que o uso de membrana acelerou a regeneração óssea nos defeitos ósseos.

Outra importante propriedade da membrana de látex, estudada nos últimos anos, é a capacidade de incorporar fármacos e partículas biológicas e liberá-los no local da lesão, funcionando como meio de liberação sustentada de compostos (HERCULANO et al., 2009; PHAECHAMUD; ISSARAYUNGYUEN; PICHAYAKORN, 2016; ZANCANELA et al., 2019).

Visando a utilização em regeneração Borges et al. (2015) desenvolveram um método para revestir e incorporar CaP nas membranas com o objetivo de associar as propriedades osteoindutoras do CaP e do látex. Os pesquisadores realizaram o

revestimento biomimética da membrana, com baixas temperaturas e mostraram através de microscopia eletrônica de varredura que esse método permitiu revestir as membranas com CaP.

2.5. Fosfato de Cálcio e suas aplicações biomédicas

As cerâmicas CaP são amplamente utilizadas em aplicações biomédicas para auxiliar na regeneração óssea, pois o CaP é um material biocompatível, que promove osteoindução e osteointegração. O CaP é o principal constituinte inorgânico do osso, encontrado na forma de cristais de hidroxiapatita (ELIAZ; METOKI, 2017; JEONG et al., 2019; MALHOTRA; HABIBOVIC, 2016).

Em 1920 foi realizada a primeira tentativa de aplicação dos CaP, sintetizado em laboratório, para auxiliar a regeneração óssea. Neste estudo, o CaP foi utilizado em fratura de ossos de coelhos e os pesquisadores observaram, através de exames de raios-X, que a sua utilização acelerou a reparação óssea (ALBEE, 1920). Após anos de pesquisas sobre as propriedades físico-químicas do CaP, diversas formas de aplicação foram desenvolvidas, como por exemplo: utilização como grânulos, em pó, pastas, cimentos ósseos, *scaffolds* biodegradáveis e revestimentos de implantes (ELIAZ; METOKI, 2017).

O CaP pode precipitar, ou seja, tornar-se sólido, em diferentes fases, como por exemplo: HAp, octofosfato de cálcio (OCP) e trifosfato de cálcio (TCP). A fase de precipitação do CaP depende de fatores como: concentração dos íons, pH e temperatura. A tabela 1 apresenta as fases do CaP utilizadas em aplicações biomédicas, bem como suas principais características (ELIAZ; METOKI, 2017).

Para ser eficiente em aplicações biomédicas, os CaP devem ter propriedades de bioatividade, biocompatibilidade, osteointegração, osteocondução e osteoindução. Além disso é importante que seja bioestável, que possua boa estabilidade mecânica e boa capacidade de degradação (ELIAZ; METOKI, 2017).

A bioatividade, refere-se à capacidade do material de participar de processos biológicos. As cerâmicas de CaP têm a capacidade de dissolver-se e assim liberar íons Ca e PO_4^{3-} , induzindo a precipitação de apatita biológica no local (ELIAZ; METOKI, 2017). Os íons Ca causam a maturação óssea através da calcificação. Além disso, leva a sinalização celular, gerando: estímulo para as células ósseas maduras através da formação de óxido nítrico; estímulo para a via de síntese óssea

osteoblástica; aumento da vida útil dos osteoblastos e regulação das funções reabsortivas dos osteoclastos. Os íons P, por sua vez, regulam a diferenciação e o crescimento dos osteoblastos e osteoclastos; aumentam a expressão de BMPs; sinalizam *feedback* negativo entre RANKL e sua sinalização por receptor e; regulam a proporção de RANKL/OPG, para inibir a diferenciação dos osteoclastos (JEONG et al., 2019).

A porosidade também é um fator que afeta a bioatividade dos CaP, pois, quanto mais poroso for, maior será seu contato com fluidos corporais, o que aumenta sua taxa de dissolução. Ainda, a presença de poros na superfície afeta a absorção de proteínas (JEONG et al., 2019).

As cerâmicas de CaP possuem ótima biocompatibilidade, visto que, Ca e P são encontrados em abundância no organismo, em sua forma sólida ou dissolvidos. Isso garante que a utilização de CaP nos ossos não gere reações inflamatórias no local (ELIAZ; METOKI, 2017; JEONG et al., 2019; MALHOTRA; HABIBOVIC, 2016).

As propriedades osteoindutoras e osteocondutoras dos CaP também são importantes. A osteoindução refere-se à capacidade de induzir a diferenciação de células ósseas, enquanto que, a osteocondução é definida como a capacidade de crescimento ósseo na superfície dos materiais (JEONG et al., 2019; SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013). Os efeitos bioquímicos relacionados as propriedades osteoindutoras e osteocondutoras do CaP podem ser descritos resumidamente em três etapas: (1) dissolução parcial da fase do CaP implantada e subsequente liberação de íons Ca e PO_4^{3-} no microambiente; (2) precipitação e incorporação dos íons em cristais de apatita na matriz de colágeno; (3) aumento da quimiotaxia, em consequência aos aumentos nas concentrações de Ca e P, com subsequente aumento na proliferação e diferenciação de células osteogênicas, levando ao processo de regeneração natural (DUCHEYNE; QIU, 1999; ELIAZ; METOKI, 2017; JEONG et al., 2019).

A taxa de dissolução do CaP é diferente para as suas fases de precipitação, de maneira a solubilidade é inversamente proporcional à proporção de íons Ca / P e depende de fatores como o conteúdo da fase, tamanho das partículas, cristalinidade, porosidade, acidez local e temperatura, pureza, tamanho do cristal e área de superfície (ELIAZ; METOKI, 2017; JEONG et al., 2019). A fase HAp, por exemplo, não se dissolve facilmente *in vivo*, sendo que, implantes feitos de HAp puro, podem permanecer no corpo por anos após um implante. As fases OCP e TCP por sua vez,

dissolvem-se mais rápido nos fluidos corporais, por isso, quando o objetivo é a utilização de materiais biodegradáveis, essas fases são mais utilizadas. (ELIAZ; METOKI, 2017). Outros fatores podem interferir no processo de dissolução e substituição óssea dos CaPs, sendo eles, idade, sexo e saúde metabólica geral do receptor, bem como do local anatômico (AMBARD; MUENINGHOFF, 2006).

Tabela 1: Características das fases de CaP utilizadas em aplicações biomédicas.

Nome	Fórmula	Razão molar Ca / P	Solubilidade a 37°C (-log K _s)
MCPM (Fosfato de cálcio monobásico hidratado)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0,5	-
DCPA (Difosfato de cálcio anidro, Monetita)	CaHPO ₄	1,0	7,02
DCPD (Difosfato de cálcio desidratado, Brushita)	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1,0	6,63
OCP (Octafosfato de cálcio)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5 H ₂ O	1,33	95,9
α-TCP (α-trifosfato de cálcio)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5
β-TCP (β-trifosfato de cálcio)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	29,5
ACP (Fosfato de cálcio amorfo)	CaxHy(PO ₄)z·nH ₂ O	1,2-2,2	11
HAp (Hidroxiapatita)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	117,2
TTCP (Tetrafosfato de cálcio)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,0	37-42

Fonte: ELIAZ; METOKI (2017).

2.5.1. β – trifosfato de cálcio

O β-TCP juntamente com o α-TCP são fases do TCP. O β-TCP precipita-se em temperaturas entre 900 e 1100°C, enquanto que o α-TCP forma-se em temperaturas próximas à 1125°C. A fórmula química do β-TCP é β-Ca₃(PO₄)₂ e sua razão Ca / P igual a 1,5 (ELIAZ; METOKI, 2017).

A fase β-TCP é amplamente estudada para aplicações biomédicas pois apresenta como vantagens estrutura química mais estável e maior taxa de degradação quando comparado ao α-TCP e por isso é mais utilizado na regeneração óssea. Esse biomaterial já foi utilizado de diversas formas para auxiliar na

regeneração óssea, como por exemplo: em revestimento de implantes, pastas, matriz para liberação de compostos e cimentos (JEONG et al., 2019).

A utilização de β -TCP para regeneração de defeitos ósseos associada a utilização de membranas na ROG, têm sido proposta como método auxiliar na regeneração óssea, com resultados promissores (RAMALINGAM et al., 2016). Porém poucos são os estudos para incorporar o β -TCP às membranas, como método de liberação sustentada do material nos defeitos ósseos.

Hipótese

3. HIPÓTESE

A utilização da membrana de látex revestida com o β -TCP pode ser um biomaterial capaz de melhorar o processo de reparação do tecido ósseo em ossos osteopenicos e/ou osteoporóticos.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da membrana de látex revestida com β -TCP no reparo tecidual de defeito ósseo realizado em tíbia de ratas submetidas a ovariectomia e dieta com déficit de vitamina D.

4.2. Objetivos específicos

- Comparar os efeitos regenerativos do β -TCP, membrana de látex e membrana de látex revestida com β -TCP na regeneração de ossos osteopênicos.
- Comparar a regeneração óssea de ossos osteopênicos e não osteopênicos.
- Avaliar os padrões morfométricos, biomecânicos, histológicos e moleculares da evolução da regeneração óssea.

Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Ética experimental

Este trabalho seguiu as normas descritas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal e do *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS, 1985). O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP/USP, sob o protocolo nº 094/2017.

5.2. Obtenção do β -TCP

O β -TCP utilizado neste estudo foi sintetizado e fornecido pelo Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (FCFAR/UNESP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano.

Os reagentes de qualidade analítica utilizados para a síntese de β -TCP foram: nitrato de cálcio – $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{H}_2\text{O}]$, ácido fosfórico 85% (H_3PO_4) e metanol (CH_3OH).

O β -TCP foi obtido a partir do método de sol-gel (figura 1). Para isso os reagentes nitrato de cálcio e ácido fosfórico 85% (resfriado em banho de gelo) foram dissolvidos separadamente em metanol sob agitação. A solução de ácido fosfórico foi adicionada ao nitrato de cálcio em banho de gelo permanecendo sob agitação restante. As concentrações dos reagentes foram escolhidas de modo a obter uma solução Ca/P de 1,5 mols. A solução obtida foi seca a 100°C por 48h, até a evaporação do solvente e o pó obtido foi tratado a 1100°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C/min para obter o β -TCP. (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; SANTOS et al., 2005). Para obter tamanhos de partículas semelhantes foi utilizada uma peneira com tamanho de poros de 2 μm . Com auxílio de um pistilo o pó foi peneirado e após isso foi despejado em um recipiente que passou por agitação por um minuto com razão mássica de 40%.

Figura 1: Síntese do β -TCP pelo método sol-gel.

Fonte: Miranda (2018).

5.3. Produção das membranas

5.3.1. Membrana de látex

O látex utilizado neste estudo foi cedido pelo Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAR/UNESP, e foi adquirido da empresa BDF® Comércio de Produtos Agrícolas Ltda. (Guarantã, SP, Brasil).

O látex natural utilizado provém de mistura dos clones RRIM 600 e PB 235. Posteriormente a sua retirada das seringueiras o látex foi centrifugado a 60% com o objetivo de suprimir proteínas com capacidades de indução de reações alérgicas. Uma concentração de 0,5% de amônia foi adicionada para preservar o látex em sua forma líquida, até que fossem confeccionadas as membranas. A tabela 2 mostra a composição e as características do látex utilizado.

Tabela 2: Características do látex natural.

Requisitos	Valores
Sólidos totais	61
Borracha seca	60
Diferença entre sólidos totais e borracha seca	1,00
NH ₃	0,71
pH	10,20
Viscosidade	30 s
Estabilidade mecânica	515
VFA	0,0136
Cor	Normal
Odor	Normal

Fonte: BDF® Comércio de Produtos Agrícolas Ltda.

A produção das membranas seguiu o método de deposição simples (*casting*), onde, 4mL de látex natural líquido foram depositados em uma placa de *Petri* de 60mm de diâmetro (figura 2A). Em seguida as placas foram alojadas em estufa à 24°C, por 48h, até estarem completamente polimerizadas (figura 2B), formando uma membrana de aproximadamente 0,2mm de espessura. As membranas foram esterilizadas em óxido de etileno pela empresa Oxetil®, (Santo Anastácio, SP, Brasil) e previamente à sua utilização, as membranas foram cortadas, com material estéril, em tamanho adequado, com medidas em torno de 1x0,6 cm (figura 2C).

Figura 2: Produção membrana de látex natural.

A) Látex líquido depositado em placa de Petri B) Membrana de látex natural polimerizada. C) Membrana moldada para utilização no procedimento cirúrgico.

Fonte: Próprio autor.

5.3.2. Membrana de látex revestida com β -TCP

Para revestir e incorporar o β -TCP nas membranas de látex natural, primeiramente, foi realizada a polimerização do látex natural, seguindo o mesmo

protocolo descrito e apresentado no subcapítulo 5.3.1. Em seguida, foi adicionada sobre as membranas uma suspensão contendo 10mL de água ultra-filtrada misturada à 10mg de β -TCP, deixando-a secar em estufa a 50°C por 24 horas (figura 3). Segundo Borges et al. (2015) esse método faz com que o CaP fique aderido na superfície, bem como, entre no interior da membrana.

Após, as membranas também foram esterilizadas em óxido de etileno pela empresa Oxetil® (Santo Anastácio, SP, Brasil) e previamente à sua utilização, as membranas foram cortadas, com material estéril, em tamanho adequado.

Figura 3: Membrana de látex natural com suspensão de água e β -TCP.

Fonte: Próprio autor.

5.4. Animais experimentais

Foram utilizadas 50 ratas da linhagem Sprague Dawley, com sete semanas de idade e peso médio de 200g $\pm$ 20g. Os animais foram fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura da USP do Campus de Ribeirão Preto e foram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, em ambiente com controle de temperatura (22°C $\pm$ 2), umidade (55% $\pm$ 10) e luminosidade (12h claro e 12h escuro). A água e ração para todos os animais foram fornecidas à vontade.

Cada animal recebeu um número de identificação, através de marcações na cauda, feitas com caneta de tinta permanente. Os animais foram mantidos em caixas coletivas de polipropileno, forradas com maravalha, com 5 animais em cada caixa. Antes de qualquer intervenção, os animais permaneceram 2 dias no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, para adaptação ao novo ambiente.

5.5. Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, com 10 animais cada. Os procedimentos realizados em cada grupo experimental estão descritos na tabela 3. No início do experimento 40 animais, passaram pelo procedimento de ovariectomia (OVX) e se alimentaram de ração com déficit de vitamina D3, a vontade, durante todo o experimento. Em 10 animais, foi realizado o procedimento de OVX simulada e os animais se alimentaram com ração padrão sem déficit de vitamina D3.

Após 90 dias da OVX, foi realizada a cirurgia para a confecção do defeito ósseo em todos os animais. Depois do período de tratamento de 21 dias os animais foram submetidos a eutanásia.

Tabela 3: Grupos experimentais.

Grupo experimental	Abreviatura	Indução da osteopenia	Defeito ósseo	Tratamento no defeito ósseo
Cirurgia simulada	SHAM	Não	Sim	Sem tratamento específico.
Controle	C	Sim	Sim	Sem tratamento específico.
β -TCP	BTCP	Sim	Sim	Defeito preenchido com β -TCP.
Látex	L	Sim	Sim	Defeito recoberto com membrana de látex natural.
β -TCP +látex	BTCP+L	Sim	Sim	Defeito recoberto com membrana de látex natural revestida com β -TCP.

Fonte: Próprio autor.

5.6. Métodos para indução da osteopenia

Para induzir a osteopenia nos animais, e consequente diminuição da DMO, dois procedimentos foram utilizados, sendo eles a cirurgia de OVX para simulação da menopausa e a oferta de uma dieta sem vitamina D3.

5.6.1. Dieta

A dieta com déficit de vitamina D3 foi fornecida aos animais, com exceção dos pertencentes ao grupo SHAM. A ração utilizada foi a peletizada, própria para animais de laboratório e os valores de vitamina D3 contidos em sua ração foram considerados insignificantes (0,0 UI/Kg; cálcio 10-14g/kg; fósforo 8,000 mg/kg).

A análise da composição centesimal das rações foi realizada no Departamento de Fármaco e Medicamentos da FCFAR/UNESP. A tabela 4 mostram a composição centesimal da ração.

Tabela 4: Composição centesimal ração com déficit de vitamina D.

Porção de 2 g	
Atividade de água	0,74
Umidade	12,33%
Cinzas	5,97%
Proteínas	19,76%
Lipídeos	5,28%
Carboidratos	56,66%
Acidez titulável (solução a 10%)	0,96%
pH (solução a 10%)	5,92

Fonte: Próprio autor.

5.6.2. Ovariectomia

Para a realização do procedimento cirúrgico de OVX, primeiramente os animais foram pesados e em seguida anestesiados com uma associação de Xilazina (3 mg/kg) e Ketamina (40 mg/kg) via intramuscular na região glútea. Em seguida foi realizada a tricotomia e assepsia da região dorsolateral, entre o rebordo costal inferior e a coxa (figura 4A).

Com o animal fixado em decúbito lateral, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele e tecido subcutâneo a cerca de 1 cm lateralmente à linha mediana (figura 4B). A parede muscular foi divulsionada até se obter acesso à cavidade abdominal, localizando o ovário (figura 4C e D). Foi realizada a ligadura da extremidade da tuba uterina e em seguida a evisceração do corno uterino, seccionando entre a ligadura e o ovário (figura 4E). A tuba uterina foi reposicionada na cavidade pélvica e em seguida foi suturada a parede muscular com fio de sutura absorvível 4.0 Vicryl® e a pele com fio de sutura não absorvível 4.0 Mononylon Ethilon® (figura 4F e G). Todo o procedimento foi repetido do lado oposto para a retirada bilateral dos ovários.

Nos animais do grupo SHAM foram realizados os mesmos procedimentos, porém não foi realizada a ligadura e evisceração dos ovários, neste grupo, os ovários foram expostos e recolocadas na cavidade pélvica.

Finalizada as cirurgias, os animais receberam analgesia com Dipirona Ibasa 50% (2,5 g/kg), via subcutânea, duas vezes ao dia, durante dois dias.

Após os procedimentos, os animais permaneceram 90 dias, em caixas coletivas com 5 animais cada, até a realização da cirurgia para confecção dos defeitos ósseos.

Os animais pertencentes aos grupos ovariectomizados se alimentaram de ração com déficit de vitamina D, enquanto que os animais do grupo SHAM se alimentaram com ração padrão.

Figura 4: Procedimento cirúrgico de ovariectomia.

A) Posicionamento do animal e delimitação da área cirúrgica. B) Incisão de aproximadamente 1 cm no tecido cutâneo e subcutâneo. C) Incisão muscular. D) Exposição do ovário. E) Ovário após evisceração. F) Sutura muscular. G) Sutura cutânea.

Fonte: YANAGIHARA (2017).

5.7. Defeito ósseo

Os defeitos ósseos foram realizados nas tíbias de todos os animais. Primeiramente, os animais foram pesados e em seguida anestesiados com associação de Xilazina (3 mg/kg) e Ketamina (40 mg/kg), aplicada via intramuscular na região glútea, no membro pélvico esquerdo. Os animais receberam também uma dose de 0,1mL de pentabiótico, aplicado via intramuscular, na região glútea do membro pélvico direito.

Após instalado o efeito do anestésico foi realizada a tricotomia e a assepsia dos membros pélvicos. Os animais foram então posicionados em decúbito dorsal, fixando os membros pélvicos em rotação externa e tríplice flexão. Gases embebidas em solução fisiológica estéril foram colocadas sobre os olhos dos ratos para evitar ressecamento das córneas. Os materiais utilizados durante a cirurgia foram previamente esterilizados.

O terço proximal da tíbia foi mensurado e aproximadamente 1 cm abaixo da articulação do joelho foi realizada uma incisão linear na pele e na musculatura com lâmina de bisturi número 15 (figura 5 A). Em seguida, a pele e os músculos foram cuidadosamente afastados e posicionados com auxílio de afastadores para expor a superfície óssea (figura 5B).

A posição do defeito foi padronizada em 1 cm abaixo da articulação do joelho na face medial da tíbia. O defeito ósseo foi realizado por uma broca trefina WF Cirúrgicos® (Barueri, SP, Brasil) de 2,9 mm de diâmetro externo e 2,7 mm de diâmetro interno, acoplada a um motor de baixa rotação Micro Motor 210/105L, Strong®, sob irrigação constante de solução fisiológica estéril. O osso cortical foi removido, criando o defeito ósseo (figura 5 C).

Nos animais do grupo BTCP, o defeito foi preenchido com β -TCP em pó e (figura 5 D). Nos animais dos grupos L e BTCP+L, as membranas, previamente esterilizada e moldada em tamanho adequado, foram posicionadas sobre o defeito ósseo, envolvendo parte da tíbia, protegendo o coágulo sanguíneo autógeno (figura 5 E).

Posteriormente, a musculatura foi suturada com fio de sutura absorvível 4.0 Vicryl® e a pele com fio de sutura não absorvível 4.0 Mononylon Ethilon® (figura 5 F).

Todos os procedimentos foram realizados bilateralmente.

Para fins de analgesia, foi administrado Dipirona Ibaso 50% (2,5 g/kg), via subcutânea, duas vezes ao dia, durante os dois primeiros dias de pós-operatório.

Nos dias subsequentes a cirurgia, foi realizada a análise clínica dos animais, avaliando a presença ou não de edema, deformidades, movimentação espontânea dos membros pélvicos e estresse do animal, verificado através do aspecto geral do animal, perda de massa corporal e presença de porfirina na região periorbitária e focinho.

Figura 5: Confecção do defeito ósseo.

A) Identificação da região 1cm abaixo da articulação do joelho. B) Exposição do terço proximal da face medial da tíbia. C) Defeito ósseo. D) Defeito ósseo preenchido com β -TCP. E) Defeito ósseo recoberto por membrana de látex. F) Sutura.

Fonte: Próprio autor.

5.8. Eutanásia e preparo dos materiais para análises

Após 21 dias da realização dos defeitos ósseos os animais foram submetidos a eutanásia com doses excessivas de anestésicos Xilazina e Ketamina.

Imediatamente após a morte, foi feita a coleta de 6 a 8 mL de sangue através de punção cardíaca e armazenado em Tubo Falcon com heparina. Em seguida, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada Universal 320r Hettich® (Tuttlingen, BW, Alemanha) em 500G, durante 10min a 4°C. O plasma foi separado e congelado a - 20°C, para análise do hormônio folículo estimulante (FSH).

As tíbias esquerdas e direitas foram dissecadas, identificadas e armazenadas seguindo o protocolo específico para cada análise, como descrito na tabela 5.

Tabela 5: Análises e protocolos de armazenamento das tíbias.

	Análise (s)	Armazenamento
	Macroscópica (massa e comprimento ósseo)	
Tíbias direitas	Densitometria	Freezer -20°C
	Microtomografia computadorizada (micro-CT)	Álcool 70%
	Ensaio mecânico	
Tíbias esquerdas	Histologia	Formol 10%
	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	Freezer -80°C

Fonte: Próprio autor.

5.9. Análise do hormônio folículo estimulante

A concentração plasmática do FSH foi realizada para confirmar a eficácia da cirurgia de OVX. A análise foi realizada no Departamento de Fisiologia da FMRP/USP, por meio do método de radioimunoensaio de duplo anticorpo, utilizando hormônio de iodação, anticorpo específico para FSH e hormônio padrão de referência, ambos obtidos pelo *National Hormone and Peptide Program* (Harbor-UCLA Medical Center, EUA).

5.10. Análise macroscópica dos ossos

Os ossos foram pesados em balança de precisão Marte® modelo AM220, com precisão de 0,01 g.

O comprimento total das tíbias, bem como a distância entre o platô tibial e a região central do defeito, foram medidos, com os ossos sempre na mesma posição,

com paquímetro digital Mitutoyo® com precisão de 0,01 mm pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

Figura 6: Medidas de comprimento da tíbia.

A) Comprimento total. B) Medida da distância entre o platô tibial e região central do defeito ósseo.

Fonte: próprio autor.

5.11. Densitometria

A densitometria foi realizada em um densitômetro de dupla emissão de raios-X Lunar®, modelo DPX-IQ (Boston, MA, EUA) pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi utilizado o programa para exames de ossos de pequenos animais em modo de alta resolução.

As tíbias foram posicionadas com o defeito ósseo para cima e imersas sob profundidade de 2 cm de álcool 70% em um recipiente plástico. Para estabilizar o posicionamento durante o exame, as tíbias foram fixadas com cera ortodôntica em sua extremidade distal. Dessa forma, a incidência de raios-X foi no sentido médio-lateral. Com auxílio do mesmo programa computacional utilizado na aquisição das imagens, foi realizada a análise dos exames. Usando a ferramenta de seleção manual, a região interesse do objeto (ROI) com área de 8,6 mm² foi posicionado no local do defeito, onde foi medida a DMO e conteúdo mineral ósseo (CMO). Para posicionamento do ROI utilizou-se a medida realizada com paquímetro entre o platô tibial e o defeito ósseo (Figura 7).

Figura 7: Esquema demonstrativo das medidas realizadas para posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo para análise de DMO.

A) Medida entre platô tibial ao centro do feito ósseo. B) Transposição da medida na imagem escaneada pelo densitômetro.

Fonte: Próprio autor.

5.12. Microtomografia computadorizada

As tíbias armazenadas em freezer -20°C e posteriormente foram submetidas a 24 horas em solução de formol 10%, e então inseridas em álcool 70% para serem transportadas até o local de realização da análise.

As análises da microtomografia computadorizada (micro-CT) foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Foi utilizando o microtomógrafo SkyScan modelo 1172, Bruker[®] (Kontich, AN, Bélgica) com os seguintes parâmetros:

- Fonte de raios-X de 70 kV;
- Corrente de 114 μA ;
- Pixel de 15 μm
- Passo de rotação de $0,5^{\circ}$ ao longo de 360° .

As reconstruções das imagens em modelos 3D foram feitas utilizando o programa NRecon[®], versão 1.6.9.8, Bruker[®], (Kontich, AN, Bélgica), que obtém as secções transversais e axiais das estruturas internas dos ossos, as quais foram realinhadas para melhor visualização do defeito ósseo por meio do programa DataViewer[®], versão 1.0.5.2, Bruker[®] (Kontich, AN, Bélgica).

Para as análises quantitativas foi utilizado o programa de análise da tomografia computadorizada CTAn[®], versão 1.14.4, Bruker[®] (Kontich, AN, Bélgica). Um ROI circunferencial de 3mm de diâmetro, foi delimitada na região do defeito ósseo,

utilizando sempre o mesmo volume de interesse (figura 8). Os parâmetros analisados foram:

- Fração de volume de osso pelo volume total (BV/TV - %);
- Espessura trabecular (Tb.Th - mm);
- Número de trabéculas (Tb.N – 1/mm);
- Separação trabecular (Tb.Sp - mm).

As medidas morfométricas ósseas e a nomenclatura seguiram as recomendações da *American Society of Bone and Mineral Research*.

Figura 8: Posicionamento do ROI nas imagens de micro-CT.

A) Alinhamento da tíbia do software Data Viewer no plano transversal e no plano sagital. B) Delimitação do volume de interesse no programa CTAn. C) Posicionamento da região de interesse (ROI) sobre o defeito; em vermelho ROI total e em azul claro ROI interno.

Fonte: YAMANACA (2020).

5.13. Ensaio mecânico

O ensaio mecânico de cisalhamento das tíbias foi realizado em Máquina Universal de Ensaio, Modelo DL10.000, EMIC® (São José dos Pinhais, PR, Brasil) pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, utilizando uma célula de carga com capacidade de 500 N.

Para realização dos ensaios as tíbias foram reidratadas em solução fisiológica estéril por 12 horas. A extremidade distal de cada tíbia foi incluída em resina acrílica de polimetilmetacrilato, utilizando pó polímero metil metacrilato e líquido monômero metil metacrilato autopolimerizante. A inclusão foi feita para facilitar a fixação do osso na morsa presa na Máquina Universal de Ensaios.

As tíbias foram fixadas pela extremidade distal na morsa e a aplicação da força foi realizada na extremidade proximal, distante 8 mm do centro do defeito. O ponto de apoio foi posicionado na região central do defeito (figura 9).

As propriedades mecânicas do osso foram avaliadas por meio do ensaio mecânico de flexão bi-apoiado. A aplicação da força foi realizada na extremidade proximal da tíbia, no sentido pósterio-anterior, com velocidade de 5 mm/min, fazendo com que a face externa do defeito fosse submetida a um carregamento de cisalhamento. Foi utilizada uma pré-carga de 5N e tempo de acomodação de 30s.

O programa Tesc versão 13.0, EMIC® (São José dos Pinhais, PR, Brasil) foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento para cada osso ensaiado e obter as propriedades mecânicas de força máxima e rigidez relativa.

Figura 9: Posicionamento da tíbia para realização do ensaio mecânico

A) Acessório de aplicação da força. B) Suporte de apoio. C) Fixação na morsa.

Fonte: Próprio autor.

5.14. Histologia

Após serem dissecados os ossos destinados para análises histológicas, foram imersos em formol 10%, por 24 horas para fixação do tecido. Em seguida, as tíbias foram identificadas em saquinhos individuais de filó e então descalcificadas em ácido

etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por aproximadamente 60 dias à temperatura ambiente, com troca da solução 2 vezes por semana.

Após o período de descalcificação os ossos foram lavados em água corrente *overnight*. Em seguida, em equipamento histotécnico pertencente ao Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP), os ossos foram desidratados em séries crescentes de álcool de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada concentração. Subsequentemente os ossos foram diafanizados em uma sequência de três xilóis, por 1 hora em cada e em três banhos em parafina (55°C) por 1 hora em cada. A extremidade distal das tíbias foi desprezada com auxílio de uma navalha de alta performance. Utilizando suportes metálicos, foram confeccionados os blocos retangulares de parafina de modo que a face medial da tíbia ficasse voltada para baixo, para que o defeito ficasse exposto na superfície de corte (figura 10).

Figura 10: Desenhos esquemáticos do posicionamento do osso para confecção blocos histológicos.

A) Região da tíbia descartada. B) Tíbia com o defeito (face medial) sendo girada em 90°, de modo que o defeito ficasse para baixo, ao ser preparado os blocos de parafina. De acordo com esse procedimento a face medial da tíbia ficaram exposta para os cortes.

Fonte: Próprio autor.

Os blocos foram seccionados em cortes longitudinais de 5 µm de espessura, utilizando um micrótomo RM 2165, Leica® (Wetzlar, HE, Alemanha). Em cada tíbia foram realizados cerca de 52 cortes seriados, até percorrer toda a profundidade do defeito. Os cortes foram capturados em lâminas de vidro silanizadas, sendo posicionados 2 cortes em cada lâmina. Das 26 lâminas obtidas 13 foram coradas pela técnica de Tricrômico de Masson, 7 pela técnica de *Picro sirius red* e 6 reservadas para análises futuras de imunohistoquímica. Na figura 11 pode-se observar a distribuição das lâminas para análise.

Figura 11: Esquema de distribuição das lâminas para análises histológicas.

Fonte: Próprio autor.

5.14.1. Histomorfometria do osso

Por meio das lâminas coradas pela técnica de Tricrômio de Masson foi avaliada a área de osso neoformado no local do defeito ósseo. As fotomicrografias foram obtidas, na objetiva de 5x, em microscópio óptico Axion Observer Z1, Zeiss® (Oberkochen, BW, Alemanha) acoplado a uma câmera digital. A aquisição das imagens foi realizada utilizando o *software Zenn 2.3 blue edition*, Zeiss® (Oberkochen, BW, Alemanha) pertencente ao Laboratório de Metrologia da FORP/USP.

Utilizando o programa NIS *Elements* 3.2 Nikon® (São Paulo, SP, Brasil), pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Fundação Odontológica da FORP/USP, foi delimitada o ROI, correspondente a área total do defeito. Dentro dessa região foi realizada a análise de densitometria óptica, captando as áreas demarcadas pelos tons de azul, correspondente a osso. A somatória das áreas demarcadas foi quantificada, sendo excluídas as regiões que não representavam osso (figura 12). A quantidade de osso foi expressa pela razão da área de osso (B.Ar) pela área total do defeito (Tt.Ar).

Figura 12: Análise histomorfométrica da região do defeito.

A) Delimitação da ROI, correspondente a área total do defeito. B) Identificação das áreas correspondente a osso (Tt.Ar). C) Quantificação de osso na área demarcada (B.Ar), excluindo-se a área externa ao ROI. (Tricrômio de Masson, aumento de 50 X).

Fonte: YAMANAKA (2020).

5.14.2. Histomorfometria do colágeno

A avaliação da área de colágeno foi realizada por meio das lâminas coradas pela técnica de *Picro Sirius red*. As fotomicrografias foram obtidas no microscópio com luz polarizada Zeiss® (Oberkochen, BW, Alemanha), pertencente ao Laboratório de Proteínas e Histologia da FORP/USP, na objetiva de 5x.

Utilizando o programa NIS *Elements* 3.2, Nikon® (São Paulo, SP, Brasil), pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Fundição Odontológica da FORP/USP, foi realizada a análise de densitometria óptica das fibras colágenas, que captou as diferentes tonalidades e quantificou a somatória das áreas (figura 13). A quantidade de colágeno foi expressa pela razão da área de colágeno (Col.Ar) pela área total do defeito (Tt.Ar).

Figura 13: Análise de densitometria óptica das fibras de colágeno no defeito.

A) Delimitação do ROI, correspondente a área total do defeito (Tt.Ar). B) Demarcação das áreas correspondentes a colágeno. C) Quantificação da área demarcada, excluindo-se a área externa ao ROI (Col.Ar). (*Picro sirius red*, aumento de 50 X).

Fonte: YAMANAKA (2020).

5.15. PCR em tempo real

As tíbias destinadas às análises de qPCR imediatamente após serem dissecadas, foram cortadas, em ambiente estéril, utilizando disco de carborundum acoplado a um motor de baixa rotação Micro Motor 210/105L, Strong®. Foram realizados 2 cortes transversais, com 0,5 cm de distância entre eles, e um corte longitudinal ao osso para isolar a região do defeito ósseo (figura 14).

Figura 14: Representação da área de corte para realização da análise de qPCR.

Fonte: Próprio autor.

Em seguida os fragmentos foram armazenados em microtubos contendo solução inativadora de RNase (RNAlater), Sigma Aldrich® (San Luis, MO, EUA), colocados imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenados em freezer - 80°C até o processamento das amostras.

5.15.1. Extração de RNA

Para realizar a extração do RNA, primeiramente as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido utilizando gral e pistilo e colocadas em microtubos livres de RNA.

Em seguida as amostras foram homogeneizadas com 500 µL de Trizol Life Technologies® (Carlsbad, CA, EUA). Após 5min em temperatura ambiente, foi feita a adição de 100 µL de clorofórmio nas amostras que foram então homogeneizadas em agitador por 15 s, deixada em temperatura ambiente por 15 min, e centrifugada a 4°C com rotação de 12000 g por 15 min.

Após esse processo as amostras apresentaram a separação em fases, da qual o RNA foi isolado. Em seguida foram adicionados 250 µL de isopropanol mantidos a temperatura ambiente por 10 min e centrifugados a 4°C 12000 g por 10 min. O líquido sobrenadante foi desprezado, seguido por 3 lavagens com 500 µL de etanol 75%. As amostras foram então mantidas em ar ambiente para secar por 10 min e então o *pellet* de RNA foi diluído em 25 µL de água ultra-pura tratada com dietil pirocarbonato livre (DEPC). As amostras foram armazenadas em freezer -70°C.

5.15.2. Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total usando kit de transcrição reversa de alta capacidade Applied Biosystems® (Foster City, CA, EUA).

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg da amostra, adicionando 5,8 µL do kit de transcrição (2 µL de RT buffer; 0,8 µL de mix de Desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTP); 2,0 µL de RT Random Primer; 1,0 µL de Multi Scribe Reverse Transcription)

e água tratada com DEPC para totalizar 20 µL de reação. Em um termociclador as amostras foram submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min.

As amostras foram então armazenadas em freezer -20°C.

5.15.3. Teste de eficiência dos iniciadores

Antes da realização do qPCR foi realizado o teste de eficiência dos iniciadores.

Os testes dos iniciadores apresentaram eficiência de 90 a 110%, conforme indicado. Sendo 99% para GAPDH, 103% para MMP-9, 96% para RANKL, 104% para OC e 106% para OPG. A curva de eficiência de cada par de primer está apresentada na figura 15.

Figura 15: Gráficos da curva de eficiência dos iniciadores correspondentes aos genes osteocalcina (OC), metaloproteínase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG) e fator nuclear de (RANKL) e GAPDH.

Fonte: Próprio autor.

5.15.4. qPCR

A reação de qPCR foi feita utilizando o kit SYBR Green FAST, Applied Biosystems® (Foster City, CA, EUA), contendo cada par de iniciador OPG, OC, RANKL, MMP9 e como controle endógeno o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Sigma-Aldrich®, Brasil). A sequência dos iniciadores está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Sequência dos pares de iniciadores utilizados no experimento

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
OC	CATGAGGACCCTCTCTCTGC	ATAGATGCGCTTGTAGGCGT
MMP-9	AGCCGGGAACGTATCTGGA	TGGAAACTCACACGCCAGAAG
OPG	GTTCTTGACACAGCTTCACCA	AAACAGCCCAGTGACCATTC
RANKL	CCACGAACCTTCCATCATAG	TGCAGGAGAATGAAACAAGC
GAPDH	TGATGGGT GTGAACCACGAG	CCCTTCCA CGATGCCAAAGT

As amostras foram incubadas durante 2 min a 50°C, seguidas de 20s a 95°C e depois submetidas a 40 ciclos: 95°C por 3 s e 60°C por 30s no equipamento StepOne Plus, Applied Biosystems® (Foster City, CA, EUA).

A curva de dissociação foi crescente de 60°C a 95°C com aumento 0,5°C/ min. A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$.

5.16. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS® versão 21.0 e adotando o nível de significância de 5% e ajuste de Bonferroni nas múltiplas comparações.

As distribuições dos dados foram avaliadas por meio do teste Shapiro-Wilk.

Para os dados do peso corporal foi aplicado o teste Anova factorial com medidas repetidas seguida de pós teste de Tukey.

Para os dados referentes a dosagem de FSH, comprimento da tíbia, DMO, CMO, força máxima e rigidez relativa da tíbia, foi aplicado o teste ANOVA um fator e pós teste de Tukey.

Para os demais dados foi aplicado o teste de *Kruskal Wallis* e pós-teste de *Dunn*.

Para formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5®.

Resultados

6. RESULTADOS

Em apêndice estão disponíveis tabelas com os resultados estatísticos das análises (apêndices A e B).

6.1. Análise experimental

No decorrer do período experimental 2 animais morreram durante as cirurgias. No período após cirurgia para confecção dos defeitos ósseos 7 animais foram submetidos a eutanásia, pois foram observadas deformidades nos membros pélvicos, características de fratura completa da tíbia, bem como sinais de estresse nos animais, verificados pela presença de porfirina na região periorbital e ocular, pelos arrepiados e diminuição da movimentação espontânea. Não foram observados sinais de infecção na ferida cirúrgica após cirurgia para confecção dos defeitos ósseos.

Durante a eutanásia e dissecação das tíbias, a observação macroscópica mostrou que as membranas de látex permaneceram intactas e sobre os defeitos ósseos. 3 tíbias direitas foram descartadas do estudo, por apresentarem fratura completa, 2 pertencentes ao grupo BTCP e uma ao grupo SHAM. Ao final, o grupo BTCP+L ficou com 9 animais e os demais grupos com 8 animais cada. A tabela 6 e 7 apresentam o número de ossos em cada grupo experimental, bem como as análises realizadas com as amostras.

Tabela 6: Número de amostras para análise de FSH e distribuição das tíbias direitas de acordo com as análises e grupos experimentais.

Análise (s)		Grupo	n amostral
FSH		SHAM	8
		C	8
		L	8
		BTCP	8
		BTCP+L	9
Tíbias direitas	Morfologia/ Densitometria / Ensaio mecânico	SHAM	7
		C	8
		L	8
		BTCP	6
		BTCP+L	8
	Micro-CT	SHAM	6
		C	6
		L	6
		BTCP	6
		BTCP+L	6

Tabela 7: Distribuição das tíbias esquerdas de acordo com as análises e grupos experimentais.

Análise (s)		Grupo	n amostral
Tíbias esquerdas	Histologia	SHAM	4
		C	4
		L	4
		BTCP	4
		BTCP+L	5
	qPCR	SHAM	4
		C	4
		L	4
		BTCP	4
		BTCP+L	4

6.2. Peso corporal

Pode-se observar na figura 16, o gráfico de acompanhamento semanal do peso dos animais. Observa-se que os animais apresentaram crescimento progressivo no decorrer do experimento. Entre a 14^a e 15^a semana houve uma queda nos valores do peso corporal nos grupos C, BTCP, L e BTCP+L. Essa redução no peso dos animais pode ter sido influenciada pelo procedimento cirúrgico para confecção dos defeitos ósseos.

Figura 16: Massa Corporal dos animais a cada semana de experimento.

Fonte: Próprio autor

A análise estatística mostrou diferenças estatisticamente significante para as variáveis tempo, grupo e para a interação entre elas ($p < 0,001$), como pode ser visto na tabela 8 e 9 em apêndices. A partir da 3ª semana até a 14ª semana, há uma diferença estatisticamente significante entre os grupos ovariectomizados, que apresentaram maior peso corporal, em relação aos animais do grupo SHAM.

6.3. Hormônio Folículo Estimulante

Para a dosagem de FSH foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,001$). Houve um aumento significativo dos níveis de FSH nos animais ovariectomizados em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$). Além disso, o grupo BTCP foi estatisticamente diferente do grupo BTCP+L ($p = 0,012$), como pode ser observado na figura 17.

Figura 17: Gráficos da dosagem do hormônio folículo estimulante - FSH.

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Fonte: Próprio autor.

6.4. Análise macroscópica dos ossos

A análise macroscópica das amostras permitiu avaliar o comprimento e a massa óssea das tíbias.

6.4.1. Comprimento ósseo

Em relação ao comprimento foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), onde os grupos L e BTCP+L foram iguais entre si e diferentes do grupo SHAM ($p = 0,002$) que apresentou menores medidas de comprimento. Os grupos C e BTCP apresentaram valores intermediários (figura 18).

Figura 18: Gráficos do comprimento das tíbias.

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Próprio autor.

6.4.2. Massa óssea

Para as medidas de massa óssea das tíbias não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p = 0,091$). Os valores estão apresentados na figura 19.

Figura 19: Gráficos da massa das tíbias.

Fonte: Próprio autor.

6.5. Densitometria

A DMO foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p < 0,001$). Os grupos SHAM e C foram diferentes entre si ($p < 0,001$) sendo que, o grupo SHAM apresentou maiores valores de DMO. Os grupos BCTP, L e BTCP+L apresentaram valores intermediários (figura 20A). As mesmas diferenças foram verificadas para os valores de CMO (figura 20B).

Figura 20: Gráficos densitometria.

A) Densidade mineral óssea. B) Conteúdo mineral ósseo. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Próprio autor.

6.6. Ensaio mecânico

Ao comparar os valores obtidos a partir do ensaio mecânico de cisalhamento, foi observada diferença estatisticamente significativa para os valores de força máxima entre os grupos SHAM e C ($p = 0,047$), onde SHAM apresentou maiores valores de força máxima. Os demais grupos apresentaram valores intermediários (figura 21 A).

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos para os valores de rigidez relativa ($p = 0,084$) (figura 21 B).

Figura 21: Gráficos das propriedades mecânicas ósseas.

A) Força máxima. B) Rigidez relativa.

Fonte: Próprio autor.

6.7. Micro-CT

6.7.1. Análise qualitativa

A avaliação qualitativa das imagens obtidas através de micro-CT, permitiu observar que em todos os grupos experimentais houve progresso na regeneração óssea, porém em nenhum grupo houve completa reparação do defeito após 21 dias (figura 22). É possível observar que o osso neoformado é imaturo, mais poroso e fino, quando comparado as outras corticais ósseas.

Nas imagens do corte transversal do osso, observa-se que nos animais ovariectomizados o canal medular aparentemente é mais largo do que animais do grupo SHAM.

No grupo SHAM, a regeneração óssea parece ser mais acentuada, visto que a camada de tecido ósseo neoformado é maior do que nos demais grupos. O grupo controle por sua vez, foi o que aparentemente teve a menor taxa de formação óssea, pois apresenta uma camada fina de tecido ósseo neoformado, que foi suficiente para unir as bordas do defeito, mas ainda distante de restabelecer a cortical do osso. No grupo BTCP observa-se a presença de porosidades na região do defeito, bem como, no interior do canal ósseo, sendo possível que, o β -TCP ainda não tenha se dissolvido completamente. Nos grupos L e BTCP+L que foram tratados com membranas, observa-se que a formação de osso novo foi predominante no topo do defeito, em proximidade com a membrana. Nos grupos SHAM, C e BTC, o tecido neoformado

está mais ao fundo do defeito ósseo. A camada de tecido ósseo neoformado no grupo L aparenta ser mais compacta e mais delgada, enquanto que no grupo BTCP+L a camada de tecido é mais espessa e porosa.

Figura 22: Imagens Micro-CT.

A) Cortes transversais das tíbias exibindo o progresso de reparo do defeito ósseo nos grupos experimentais. Para cada grupo foram selecionadas imagens de duas amostras diferentes. B) Delimitação esquemática do fundo e todo do defeito ósseo. C) Delimitação esquemática da região central do defeito ósseo.

Fonte: Próprio autor.

6.7.2. Análise quantitativa

Os resultados de Tb.N mostraram diferenças estatisticamente significante entre os grupos ($p=0,016$). Os grupos L e C foram iguais entre si e diferentes do grupo SHAM ($p=0,023$ e $p=0,043$), que apresentou os maiores valores. Os grupos BTCP e BTCP+L apresentaram valores intermediários (figura 23 A).

Para os valores de Tb.Sp, também houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,026$), em que, o grupo SHAM foi diferente de BTCP+L ($p=0,028$), em que o grupo SHAM apresentou menor valores de separação entre as trabéculas. Os demais grupos apresentaram valores intermediários (figura 23B).

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para os resultados de BV/TV% ($p=0,150$) e Tb.Th ($p=0,093$), apresentados, respectivamente nas figuras 24 A e 24 B. No entanto, ao observar os valores absolutos, para BV/TV o grupo SHAM apresentou maiores valores e para Tb.Th o grupo L mostrou os maiores valores (tabela 14).

Figura 23: Gráficos dos parâmetros analisados através de micro-CT.

A) Número de trabéculas (Tb.N). B) Separação trabecular (Tb.Sp). ^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Próprio autor.

Figura 24: Gráficos dos parâmetros analisados através de micro-CT.

A) Fração de volume de osso pelo volume total (BV/TV - %). B) Espessura trabecular (Tb.Th - mm).

Fonte: Próprio autor.

6.8. Histologia

A análise histológica permitiu avaliar a neoformação óssea através de dados qualitativos e quantitativos.

6.8.1. Tecido ósseo neoformado

6.8.1.1. Análise qualitativa

A figura 25 mostra os aspectos morfológicos do defeito ósseo. As margens do defeito estavam bem definidas em todos os grupos. É possível observar que grande parte do defeito ósseo foi preenchido por tecido ósseo imaturo. No grupo C os espaços trabculares são maiores, bem como, há menos tecido ósseo neoformado.

Figura 25: Fotomicrografia da neoformação óssea no defeito. Coloração de Tricômio de Masson em aumento de 50x.

A) SHAM. B) C) BTCP. D) L. E) BTCP+L. Tb: espaço entre as trabéculas, ON: osso neoformado.

Fonte: Próprio autor.

6.8.1.2. Análise quantitativa

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a quantificação de tecido ósseo neoformado na área do defeito ($p=0,017$). O grupo C foi diferente de SHAM ($p=0,015$), em que o grupo SHAM apresentou melhores resultados. Os grupos BTCP, L e BTCP+L apresentaram valores intermediários. Porém em valores absolutos os grupos tratados apresentaram maiores valores de neoformação em comparação ao grupo C (figura 26).

Figura 26: Gráfico neoformação óssea expressa pela razão da área de osso (B.Ar - μm^2) pela área total do defeito (Tt.Ar - μm^2), apresentado em %.

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Próprio autor.

6.8.2. Colágeno

Para quantificação das fibras de colágeno no defeito ósseo foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,026$). O grupo C foi diferente de SHAM ($p=0,014$), e o grupo SHAM apresentou melhores resultados.

Os grupos BTCP, L e BTCP+L apresentaram valores intermediários (figura 27).

Figura 27: Gráfico das fibras de colágeno no defeito expressa pela razão da área de colágeno (Col.Ar - μm^2) pela área total do defeito (Tt.Ar - μm^2), apresentado em %.

^{ab} Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Próprio autor.

6.9. qPCR

A expressão de OC ($p=0,469$), MMP-9 ($p=0,710$), OPG ($p=0,241$) e RANKL ($p=0,770$) não diferiu entre os grupos, como pode ser observado nas figuras 28 e 29.

Figura 28: Gráficos da expressão relativa dos genes OC e MMP-9.

A) osteocalcina (OC), B) metaloproteinase 9 (MMP-9)

Fonte: Próprio autor.

Figura 29: Gráficos da expressão relativa dos genes OPG e RANKL.

A) osteoprotegerina (OPG) e B) receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL).

Fonte: Próprio autor.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Com o aumento do envelhecimento populacional, aumentam também os casos de osteoporose e consequentemente de fraturas por fragilidade óssea. As dificuldades de regeneração do tecido ósseo em indivíduos com osteoporose afetam milhões de pessoas em todo mundo, tornando-se um problema de saúde pública global, que acarreta em aumento dos custos em saúde e prejuízos na qualidade de vida dos pacientes. (CHEUNG et al., 2016; COUGHLAN; DOCKERY, 2014).

Apesar das fraturas serem a maior causa de problemas de regeneração em pacientes com osteoporose, atenção especial também deve ser direcionada para a regeneração de grandes defeitos ósseos, que podem resultar de doenças, traumas e procedimentos cirúrgicos. Os defeitos ósseos ainda são um desafio para os profissionais de saúde, principalmente em idosos com osteoporose (RUPP et al., 2018).

Dentre as alternativas para melhorar o metabolismo ósseo, os medicamentos antirreabsortivos, como por exemplo, bisfosfonatos, Denosumad e alendronato, são amplamente utilizados e podem auxiliar na recuperação óssea. Porém, estes medicamentos atuam apenas na inibição da reabsorção óssea, mas não estimulam a formação de osso novo. Em muitos casos o manejo na regeneração em pacientes com osteoporose necessita de alternativas osteopromotoras para auxiliar a neoformação de osso (BLACK; ROSEN, 2016; KATES; ACKERT-BICKNELL, 2016; LARSSON; FAZZALARI, 2014; RUSSOW et al., 2019). Por esse motivo, os biomateriais que estimulam a neoformação óssea são de grande interesse para melhorar os resultados da regeneração do tecido, porém, apesar da necessidade clínica, há poucos materiais em uso no tratamento de fraturas osteoporóticas (ALT et al., 2013; NAUTH et al., 2011). Portanto fica evidente a necessidade de investigar novos biomateriais que auxiliem na regeneração óssea em indivíduos com osteoporose.

Esse estudo avaliou os efeitos de um novo biomaterial que combina as propriedades osteoindutoras do β -TCP às propriedades regenerativas de membranas de látex natural na regeneração de defeitos ósseos em tíbias de ratas osteopenicas.

Os resultados mostraram maiores níveis de FSH e massa corporal em grupos de ratas ovariectomizadas. O grupo SHAM apresentou os melhores resultados de DMO, CMO força máxima, fração de volume ósseo neoformado e fração de colágeno, quando comparado ao grupo C. Para a análise de micro-CT na região do defeito ósseo o grupo SHAM também apresentou maior número de trabéculas em relação ao grupo C e menor espaçamento entre as trabéculas em relação ao grupo BTCP+L. Os grupos L, BTCP e BTCP+L, apresentaram valores intermediários para as análises de formação óssea no local do defeito, porém em valores absolutos é possível perceber que seus resultados foram melhores do que o grupo C.

As cerâmicas de CaP têm sido utilizadas como cimentos ou *scaffolds* para regeneração de ossos osteoporóticos. Apesar de possuírem boa capacidade de osteoindução, as cerâmicas são quebradiças, pois possuem baixa resistência mecânica (BORGES et al., 2015). Mattsson e Larsson (2006) realizaram estudo clínico, para avaliar o comportamento da fixação de fratura do colo do fêmur usando cimento de CaP. O estudo tratou 118 pacientes, com idade entre 60 e 98 anos, dos quais, 95 eram mulheres. Os participantes foram divididos em dois grupos: tratamento com redução fechada e fixação apenas com dois parafusos canulados e tratamento com parafusos combinados com injeção de CaP. Após 24 meses, houve tendência a maior taxa de reoperação nos pacientes do grupo tratado com CaP, devido à perda de redução ou necrose avascular.

Outra desvantagem no uso de algumas fases do CaP, é que apresentam baixa taxa de biodegradação e podem dispersar para a área de tecidos moles. Para melhorar as propriedades mecânicas dos CaPs, bem como, evitar problemas relacionados a dispersão do material nos tecidos, estudos têm sugerido a incorporação dessas cerâmicas em membranas, que podem ser utilizadas na regeneração guiada de defeitos ósseos (KIKUCHI et al., 2004; RAMALINGAM et al., 2016). Borges et al. (2015), por exemplo, desenvolveram um método para incorporar o CaP em membranas de látex natural, pois estas membranas, além de possuírem propriedades mecânicas que lhe garantem elasticidade, também induzem a regeneração tecidual e podem ser utilizadas como sistema para liberação sustentada de compostos biológicos. As membranas de látex foram recobertas com CaP através do método biomimética, que diferente de outras metodologias de recobrimento de superfície, não utiliza altas temperaturas, possibilitando revestir polímeros como o látex. Além disso, os autores relataram que o látex possui partículas aniônicas que

permitem revestir as membranas sem tratamentos de superfície específicos. Os autores avaliaram as membranas através de difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura e concluíram que foi possível revestir as membranas com CaP.

O método de revestimento da membrana utilizado em nosso estudo, seguiu os princípios utilizados por Borges et al. (2015), utilizando baixas temperaturas sem tratamento de superfície das membranas. A metodologia foi utilizada por Miranda (2018), em sua pesquisa, que utilizou as fases HAp, α -TCP e β -TCP, para revestimento das membranas e seus resultados indicaram que a fase β -TCP apresentou boas propriedades para revestimento, incorporação e liberação pela membrana de látex natural.

O modelo animal foi utilizado neste estudo para avaliar as propriedades dos biomateriais, pois as pesquisas em animais possibilitam boa padronização, reprodutibilidade, baixo custo e avaliação minuciosa do processo biológico, o que é essencial para assegurar que a utilização do biomaterial em humanos seja elegível e segura.

Para induzir a osteopenia nos animais, foi realizada a cirurgia de OVX e alimentação com déficit de vitamina D3. O rato ovariectomizado é o modelo padrão para estudos que envolvam a diminuição de massa óssea pós menopausa, visto que, nestes animais a instalação da perda óssea acontece em períodos relativamente curtos, além do fácil manuseio e baixo custo (KOMORI, 2015; OHEIM et al., 2016; REINWALD; BURR, 2008; THOMPSON et al., 1995). É importante salientar que, apesar de haver a diminuição de massa óssea em ratas ovariectomizadas, esses efeitos não se mantêm após um ou dois anos, sendo assim o termo mais adequado para a indução da osteopenia (LI; SHEN; WRONSKI, 1997).

No início do experimento os animais tinham sete semanas de idade e pesavam cerca de 200g, peso compatível com ratos jovens. A idade dos animais no momento da realização da OVX é um fator importante, visto que, segundo Thompson et al. (1995) a diminuição de massa óssea induzida por OVX é mais rápida em animais jovens. O período definido para instalação da osteopenia nos animais foi de 90 dias. Segundo uma revisão elaborada por Komori (2015), a perda óssea significativa na metáfise proximal da tíbia ocorre após 14 dias da OVX e essa redução será expressiva após 90 dias.

O efeito da cirurgia de OVX foi confirmado pelo aumento da concentração plasmática de FSH nos animais ovariectomizados. Os aumentos nos níveis de FSH são consequência da deficiência de estrogênio no organismo, uma vez que, esse hormônio causa um aumento expressivo de FSH. O estrogênio desempenha um papel importante no metabolismo ósseo, e sua deficiência causa aumento da atividade dos osteoclastos, tanto pelo incremento da liberação de citocinas pró inflamatórias que induzem a osteoclastogênese quanto pela diminuição significativa na apoptose dos osteoclastos, aumentando assim a reabsorção óssea. Ainda, estudos relatam que os osteoclastos e seus precursores possuem receptores de FSH, que estimulam a osteoclastogênese (KOMORI, 2015; PAIVA; GRANJEIRO, 2014; SUN et al., 2006).

Outro efeito relatado pela diminuição dos níveis de estrogênio é o aumento de ganho de peso corporal (MACEDO et al., 2017). A retirada dos ovários acarreta em diminuição da secreção de estradiol, hormônio que além de outras funções, influencia na fome e na saciedade, sendo que, quando há diminuição dos níveis de estradiol aumenta a ingestão de alimento pelos animais, acarretando no rápido ganho de peso (ASARIAN; GEARY, 2002). Neste estudo, a partir da terceira semana até a décima quarta, os animais dos grupos ovariectomizados apresentaram maior massa corporal quando comparado ao grupo SHAM. Após a cirurgia de realização dos defeitos ósseos, houve diminuição no ganho de massa dos animais. Sugere-se que essa redução possa estar associada ao estresse causado pela cirurgia.

A análise macroscópica das tíbias mostrou que nos grupos L e BTCP+L o comprimento dos ossos foi maior. Acredita-se que o peso dos animais pode ter influenciado nesses resultados, pois, apesar de, ao final do experimento o peso dos animais ser semelhante, observa-se que, durante a maior parte do tempo os grupos ovariectomizados tiveram maior peso corporal, ainda, o ganho de massa nas primeiras semanas pode estar relacionado ao aumento do crescimento das tíbias nesses grupos. Além disso, em um dos primeiros estudos sobre a padronização dos tempos de indução da osteopenia em ratas ovariectomizadas, Wronski et al. (1988), relataram que o crescimento ósseo longitudinal da tíbia, avaliado por análise histológica, foi significativamente aumentado pela OVX aos 14 dias, mas que após esse período os níveis de crescimento retornaram ao normal. Esse aumento da taxa de crescimento ósseo nas primeiras semanas após a OVX também pode justificar a diferença de comprimento das tíbias.

Além dos déficits de estrogênio, níveis reduzidos de vitamina D no organismo também levam a anormalidades na mineralização, devido à redução da função dos osteoblastos e da absorção intestinal de Ca, contribuindo para a diminuição de massa óssea (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2015). Melhus et al. (2007), assim como neste estudo, utilizaram o modelo de OVX em ratas associado a uma dieta com déficit de vitamina D3 para induzir a osteopenia. Os resultados do estudo mostraram que, após 18 semanas houve diminuição significativa da DMO de vértebra lombar e colo do fêmur, além de diminuição de osso trabecular na metáfise da tíbia dos animais. Esses autores relatam que, o modelo OVX clássico não leva em consideração o estilo de vida e os fatores predisponentes relacionados à saúde, como a dieta. Sendo assim, um modelo que combina OVX e uma dieta deficiente em vitamina D3 pode estar mais próximo do que é observado em mulheres idosas com osteoporose (MELHUS et al., 2007).

As fraturas osteoporóticas afetam principalmente a metáfise dos ossos longos, visto que, foram relatadas diferenças no padrão de cicatrização da metáfise em comparação à diáfise óssea após a fratura, com menor formação de calos periosteais na metáfise (THORMANN et al., 2014). Segundo Cheung et al. (2016) estudos com o objetivo de avaliar os efeitos de biomateriais na cicatrização de fraturas osteoporóticas devem se concentrar na região metafisária. Sendo assim foi realizado neste trabalho, defeito ósseo no terço proximal na tíbia das ratas, a fim de reproduzir as dificuldades no processo regenerativo.

Uma das limitações nesse estudo foi a dificuldade em criar um defeito ósseo crítico, uma vez que, as dimensões de um defeito crítico na região metafisária em tíbias de rato exigiriam fixação externa e dificultaria a aplicação da membrana envolvendo o defeito. Apesar de não existir ao certo, uma padronização sobre defeitos ósseos em tíbia de ratos, outros estudos corroboram com a metodologia, pois também utilizaram defeitos ósseos de 3 mm de diâmetro para avaliação da regeneração óssea. Importante observar que a medida do defeito realizado pode ser uma medida limite para as dimensões da região metafisária da tíbia, pois valores maiores que 3mm de diâmetro há grande probabilidade de ocorrer fratura no local do defeito (KIDO et al., 2017; LIU et al., 2016; PINTO et al., 2018; SEYEDMAJIDI et al., 2018).

Após a cirurgia de confecção dos defeitos ósseos nas tíbias, a análise clínica não evidenciou sinais de inflamação na ferida cirúrgica ou rejeição das membranas. As membranas de látex são biocompatíveis, pois, apesar do látex natural conter

proteínas que podem desencadear reações alérgicas, a centrifugação do látex realizada elimina a presença dessas proteínas. Balabarian et al. (2006) avaliaram a biocompatibilidade do látex em tecido ósseo através da aplicação de grânulos de látex em cavidades ósseas alveolares em ratos. Após os períodos experimentais de 7, 21 e 42 dias as análises histológicas não mostraram qualquer reação de corpo estranho, ou persistência da reação inflamatória aguda inicial. A biocompatibilidade do β -TCP também é bem relatada, visto que esse biomaterial é um dos principais componentes do tecido ósseo (JEONG et al., 2019).

Na avaliação qualitativa das imagens de micro-CT, foi possível perceber que em todos os grupos experimentais houve progresso na regeneração óssea, pois havia um tecido de conexão entre as bordas do defeito, porém em nenhum grupo houve completa reparação óssea após 21 dias. O período experimental de 21 dias foi escolhido para avaliar a regeneração óssea, entre a fase inicial e média do processo regenerativo. Segundo Histing et al. (2011) ratos adultos, com aproximadamente 26 semanas requerem cerca 10 semanas para completar o processo de regeneração de fraturas. Ainda, segundo a revisão publicada por Cheung et al. (2016), a regeneração em ossos osteoporóticos é prejudicada tanto em períodos iniciais quanto tardios, mas entre a fase inicial e média, observa-se as dificuldades a formação do tecido ósseo.

A análise qualitativa de micro-CT revelou ainda que o grupo SHAM apresentou maior formação óssea quando comparado aos grupos ovariectomizados. O aumento da neoformação óssea no grupo SHAM também foi observado nas análises histológicas, através de análises estatísticas. Como esperado a OVX causou dificuldades na regeneração óssea, pois o grupo C, ovariectomizado sem nenhum tipo de tratamento, teve menor taxa de neoformação óssea e de deposição de colágeno, quando comparada com SHAM. Esses resultados corroboram com estudos sobre os atrasos de regeneração em ossos osteoporóticos (HAK, 2018). Até o momento, são apontadas como causas das dificuldade regenerativas a baixa sensibilidade dos osteoblastos a sinais mecânicos (SHIELS; MASTRO; GAY, 2002), angiogênese reduzida (RIVARD et al., 1999), células-tronco mesenquimais reduzidas que geram diminuição da mineralização de calos ósseos, redução da DMO e das propriedades mecânicas (CHEUNG et al., 2016).

Outra característica observada nas imagens de micro-CT foi o aumento da cavidade medular nos ossos osteopênicos, demonstrando os efeitos da OVX sobre o osso cortical. Sabe-se que no osso cortical há aumento da reabsorção óssea no

endóstio e aumento da formação óssea no perióstio após a ovariectomia, levando a cavidade medular aumentada, que terá início entre 90 e 120 dias após a ovariectomia (KOMORI, 2015).

Em relação a qualidade do tecido ósseo neoformado, em todos os grupos, foi observada a presença de osso imaturo, mais poroso e fino, quando comparado as outras corticais ósseas. No grupo BTCP+L é possível perceber um tecido ósseo neoformado mais poroso, confirmado pela análise estatística que mostrou aumento no espaçamento entre as trabéculas neste grupo quando comparado ao grupo SHAM. Sugere-se que, o β -TCP aderido à membrana de látex foi liberado gradualmente pela membrana no defeito, sendo assim a porosidade do β -TCP pode ter induzido a neoformação óssea com trabéculas mais espaçadas.

Para as medidas de DMO e CMO o grupo SHAM também obteve maior densidade quando comparado ao grupo C. Levando-se em consideração que, a atenuação dos raios-X no tecido ósseo depende da crescente calcificação durante o processo de regeneração (AUGAT et al., 2014), o aumento na neoformação óssea no grupo SHAM explica o aumento da densidade mineral neste grupo. Além disso, apesar de não haver diferenças estatísticas na DMO nos grupos ovariectomizados tratados, observa-se que os valores de DMO nesses grupos foi maior que no grupo C, sugerindo que, apesar de não apresentar diferenças estatísticas, houve uma tendência de melhora na DMO dos grupos tratados.

O sucesso da cicatrização das fraturas deve ser definido pela restauração das propriedades biomecânicas do osso fraturado. Portanto, a realização de testes mecânico dos ossos em processo de regeneração, se faz importante. Neste estudo, foi observado que o grupo SHAM obteve maiores valores de força máxima que o grupo C. O CMO e a DMO são altamente correlacionadas com a resistência óssea. Os grupos ovariectomizados apresentaram valores menores de força máxima. Corroborando com nosso estudo, uma revisão sistemática sobre o processo de recuperação biomecânica durante a cicatrização de fraturas osteoporóticas com modelos de ratos OVX, mostrou que a regeneração da fratura foi atrasada e a propriedade biomecânica de força máxima do osso fraturado diminuiu em consequência da OVX (CHEN et al., 2016).

A regeneração óssea é um processo complexo que depende de muitos fatores, como, vascularização adequada, liberação de citocinas e ação coordenada de células ósseas. Neste estudo foram analisados genes importantes envolvidos no

processo de regeneração óssea por meio do q-PCR, sendo os marcadores osteoclásticos RANKL e MMP9, e os marcadores osteoblasticos OC e OPG. O RANKL é um fator expresso por osteoblastos e células do estroma, que ao se ligar ao receptor RANK sinaliza a diferenciação celular para a formação de osteoclastos. O MMP-9 é considerado um importante biomarcador envolvido na reabsorção óssea. O OPG é expresso por osteoblastos e tem como função inibir a ação de RANKL. O OC por sua vez é um importante marcador de osteoblastos maduros e que está envolvido na fase final do reparo ósseo. Porém, neste estudo os resultados tornaram-se limitados frente à quantidade de amostras utilizada após a perda de alguns animais (n=4), as quais não apresentaram diferença na expressão relativa dos genes entre os grupos.

Neste estudo, os grupos ovariectomizados tratados apresentaram valores intermediários entre C e SHAM e não apresentaram diferenças entre si para a neoformação óssea, avaliada por análises de micro-CT e histomorfometria. A observação dos valores médios, no entanto, mostra que, os grupos tratados obtiveram resultados maiores que o grupo C, para os aspectos de avaliação de neoformação óssea. Sugere-se que, o tempo experimental de 21 dias pode não ter sido suficiente para gerar diferenças expressivas entre os grupos tratados e o grupo C.

Na literatura atual, há uma grande variedade de tempos experimentais utilizados para avaliação da regeneração de ossos osteoporóticos em ratos, o que dificulta a compreensão dos processos biológicos envolvidos nesse processo (CHEUNG et al., 2016; HE et al., 2011; KUBO et al., 1999).

Em relação ao β -TCP, os efeitos deste biomaterial na regeneração óssea são bem conhecidos para osteopromoção e osteoindução. Entretanto, os modelos experimentais também têm grande variabilidade, inclusive nos tempos de tratamento, variando desde dias até meses ou anos (ELIAZ; METOKI, 2017). Sendo assim, sugere-se que, apesar dos animais tratados β -TCP mostrarem uma tendência para formação óssea melhor que o grupo controle, o período experimental deste estudo pode não ter sido suficiente para gerar diferenças estatisticamente significantes na neoformação de tecido ósseo. Em estudo realizado por Chatterjea et al. (2014) foram avaliados os efeitos das cerâmicas β -TCP e HAp na regeneração óssea de fêmur de ratos. Um defeito ósseo crítico foi confeccionado no fêmur de ratos e deixado vazio, preenchido com β -TCP ou com HAp. A regeneração óssea e a resposta inflamatória do tecido foram avaliadas aos 12 dias, 4, 6 e 8 semanas. Os autores relatam que aos 12 dias uma forte resposta inflamatória foi observada nos grupos preenchidos com as

cerâmicas e em todos os grupos a ausência de nova formação óssea. Quatro semanas após o implante, foram encontrados sinais de nova formação óssea nos grupos β -TCP e HAp, sugerindo que, o início da formação óssea ocorreu entre 12 dias e 4 semanas.

Em outro estudo realizado por Ramalingam et al. (2016), foi feita a avaliação em tempo real da regeneração óssea em defeitos na calvária de ratos usando β -TCP com e sem membrana de colágeno. Análises de micro-CT *in vivo* em tempo real foram realizadas imediatamente após a cirurgia e às 2, 4, 6 e 10 semanas para determinar o volume e a densidade mineral do osso neoformado. Os resultados mostraram que no grupo β -TCP apenas em 6 semanas houve aumento significativo do volume ósseo neoformado em comparação com os valores basais. No grupo que utilizou o β -TCP no defeito juntamente com membrana de colágeno esse aumento ocorreu em 4 semanas. Sendo assim, acredita-se que os 21 dias de tratamento utilizado em nosso estudo podem não ter sido suficientes para demonstrar os efeitos do β -TCP.

Estudos sobre os efeitos da ROG em ossos osteoporóticos, por sua vez, são escassos. A grande maioria dos estudos avalia a utilização de membranas associada com enxertos, *scaffolds* ou fatores de crescimento ósseos. Em um dos poucos estudos sobre os reais efeitos da ROG em ossos osteoporóticos Mardas et al. (2017) avaliaram a neoformação óssea em defeitos de tamanho crítico na calvaria de ratos saudáveis, osteoporóticos e osteoporóticos tratados com ratos com ácido zoledrônico, que utilizaram ou não membranas de politetrafluoretileno denso (d-PTFE) na técnica de ROG. Foram realizadas análises histológicas aos 30 e 60 dias de tratamento. Os resultados mostraram que, em ambos os períodos experimentais os grupos tratados com membranas tiveram aumento significativo neoformação óssea no defeito.

Os achados do nosso estudo não corroboram com os de Mardas et al., visto que, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos que utilizaram as membranas de látex e o grupo C, apesar de haver uma tendência, em valores absolutos, na melhora da neoformação nos grupos tratados. Uma das possíveis explicações para essa disparidade entre os estudos está relacionada também relacionada ao pouco tempo experimental utilizado, visto que, em ossos osteoporóticos pode haver uma diminuição de células tronco mesenquimais, sendo assim, mesmo que as membranas tenham atuado como barreira protetora no local da lesão e favorecido a neovascularização, a redução no número de células osteoprogenitoras torna o tempo necessário para mostrar os efeitos da ROG maior.

Corroborando com nossa suposição, Stenderup et al. (STENDERUP et al., 2003) sugerem que o envelhecimento e alterações metabólicas estão associadas à diminuição da capacidade proliferativa das células osteoprogenitoras e o número reduzido de células osteoblásticas, leva à diminuição da formação óssea. A migração das células tronco mesenquimais é fundamental para a cicatrização da fratura óssea porque o processo de reparo ósseo exige que essas células migrem para o local da lesão óssea para então, participar da neoformação de osso (SU et al., 2018).

Apesar de não ter gerado diferenças significativas, os grupos tratados com membranas, principalmente o grupo BTCP+L, mostraram uma tendência para melhorar a regeneração óssea quando comparados ao grupo C.

A habilidade das membranas de látex em estimular a neoformação óssea é atribuída a sua capacidade de melhorar a neovascularização, estimular a adesão celular e atuação na ROG, além disso uma das vantagens de sua utilização são o baixo custo e fácil manipulação. Carlos et al. (2019), utilizaram as membranas de látex na regeneração óssea guiada em tíbia de ratos. O estudo avaliou a neoformação óssea através de análises radiográfica, histológica, densitométrica e mecânica, nos tempos de 7 e 42 dias de pós-operatório e mostraram que animais tratados com a membrana de látex obtiveram uma taxa de formação óssea maior em todos os períodos avaliados. Ereno et al. (2010), por sua vez, avaliaram o uso de membrana de látex em regeneração óssea guiada na calvária de coelhos. O estudo avaliou a neoformação óssea através de análises radiográficas, histológicas e histomorfométricas, nos tempos de 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório. Seus resultados também mostraram que animais tratados com a membrana obtiveram melhora na taxa de formação óssea em todos os períodos avaliados.

Este estudo, difere do realizado por Carlos et al. e Ereno et al., visto que, estes, utilizaram ratos jovens saudáveis e não osteopenicos. Sugere-se que a utilização da membrana de látex para ROG de ossos osteopenicos e/ou osteoporóticos devem ser melhores estudados, pois até o momento os estudos desse biomaterial se concentraram na regeneração apenas de ossos saudáveis, com alimentação padrão dos animais. Sendo assim, mais pesquisas, com diferentes tempos experimentais, devem ser realizadas.

Em relação ao revestimento das membranas com β -TCP, mais estudos, com a utilização de diferentes concentrações de β -TCP para o revestimento da membrana devem ser realizados, pois, sugere-se que, apesar de as imagens de micro-CT

indicarem que a formação óssea foi influenciada pela liberação do β -TCP, as concentrações podem não ter sido suficientes para gerar efeitos expressivos.

De maneira geral, os achados deste trabalho mostram que, apesar dos resultados apontarem melhoras na regeneração óssea com o uso de membrana de látex, β -TCP e membranas de látex revestida com β -TCP nos defeitos ósseos em tíbias de ratas osteopênicas, não se pode afirmar seus efeitos, pois, os resultados não foram estatisticamente significantes. Sugere-se a realização de mais pesquisas sobre o tema, incluindo estudos com diferentes tempos e modelos experimentais.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

Nossos achados apontam que o tratamento com membrana de látex revestida com β -TCP não foi capaz de melhorar significativamente a regeneração em defeitos ósseos de tíbias em ratas submetidas a ovariectomia e dieta com déficit de vitamina D3 após 21 dias tratamento. Mais estudos são necessários para esclarecer os efeitos dos biomateriais em ossos osteoporóticos.

Sugestões Para Trabalhos Futuros

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O uso de membranas de látex revestidas ou não com β -TCP para regeneração guiada em ossos osteoporóticos deve ser melhor estudada. Sugerimos a realização de pesquisas futuras com maior tempo experimental.

Além disso, outra proposta de estudo futuro, é verificar a ação de membrana de látex revestida com diferentes concentrações de β -TCP. Pode-se também utilizar a associação do preenchimento do defeito ósseo com β -TCP ao uso de membranas de látex recobrindo o local.

Além disso, a partir da revisão sobre ROG em ossos osteoporóticos, realizada neste estudo, foi possível perceber a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos reais de diferentes membranas na ROG de ossos osteoporóticos, visto que, a maioria dos estudos, avalia os efeitos da ROG associada ao uso de enxertos ou fatores de crescimento. Sendo assim, sugere-se a realização de trabalhos que avaliem a ROG em ossos osteoporóticos, com diferentes membranas, tempos experimentais e modelos de defeitos ósseos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBEE, F. H. Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Annals of surgery**, v. 71, n. 1, p. 32–9, 1920.
- ALMEIDA, M. et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 135, 2017.
- ALT, V. et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 6, p. 7035–7042, 2013.
- AMBARD, A. J.; MUENINGHOFF, L. Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 5, p. 321–328, 2006.
- ANDRADE, T. A. M. et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 1036–1047, 2011.
- ANDRZEJOWSKI, P.; GIANNOUDIS, P. V. The “diamond concept” for long bone non-union management. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 20, n. 1, p. 21, 2019.
- ARMAS, L. A. G.; RECKER, R. R. Pathophysiology of Osteoporosis: New Mechanistic Insights. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 475–486, 2012.
- ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic Estradiol Treatment Normalizes Body Weight and Restores Physiological Patterns of Spontaneous Feeding and Sexual Receptivity in Ovariectomized Rats. **Hormones and Behavior**, v. 42, n. 4, p. 461–471, 2002.
- AUGAT, P. et al. Imaging techniques for the assessment of fracture repair. **Injury**, v. 45, n. SUPPL. 2, p. S16–S22, 2014.
- BACCARO, L. F. et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583–591, 2015.

- BALABANIAN, C. A. C. A. et al. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of oral science**, v. 48, n. 4, p. 201–205, 2006.
- BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAÚJO, R. P. C. DE. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 7, n. 3, p. 309–315, 2007.
- BLACK, D. M.; ROSEN, C. J. Postmenopausal Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 3, p. 254–262, 2016.
- BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193–1205, 2015.
- BORGES, F. A. et al. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 17, p. 1256–68, 2015.
- BORGES, F. A. **Aplicação da membrana de látex natural (NRL) como suporte para cultura das células osteogênicas MC3T3-E1 para regeneração óssea guiada (GBR)**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2015.
- BUZA, J. A.; EINHORN, T. Bone healing in 2016. **Clinical cases in mineral and bone metabolism**, v. 13, n. 2, p. 101–105, 2016.
- CARLOS, B. L. et al. Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, n. 14, p. 1291–1307, 2019.
- CHATTERJEA, A. et al. Inflammatory response and bone healing capacity of two porous calcium phosphate ceramics in critical size cortical bone defects. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 5, p. 1399–1407, 2014.
- CHEN, L. et al. Biomechanical Characteristics of Osteoporotic Fracture Healing in Ovariectomized Rats: A Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153120, 2016.
- CHEUNG, W. H. et al. Fracture healing in osteoporotic bone. **Injury**, v. 47, p. S21–S26, 2016.
- COUGHLAN, T.; DOCKERY, F. Osteoporosis and fracture risk in older people. **Clinical Medicine**, v. 14, n. 2, p. 187–191, 2014.
- DEREKA, X. et al. Osseointegration in osteoporotic-like condition: A systematic review of preclinical studies. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 6, p. 933–940, 2018.

- DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, n. 23–24, p. 2287–2303, 1999.
- EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45–54, 2015.
- ELGALI, I. et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European journal of oral sciences**, v. 125, n. 5, p. 315–337, 2017.
- ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 334–438, 2017.
- ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95A, n. 3, p. 932–939, 2010.
- FERREIRA, M. et al. Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 3, p. 564–569, 2009.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.
- FRADE, M. A. C. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157–162, 2004.
- FRADE, M. A. C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 45–51, 2012.
- GHIASI, M. S. et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. **Bone reports**, v. 6, p. 87–100, 2017.
- GRUBER, R.; STADLINGER, B.; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. **Clinical oral implants research**, v. 28, n. 9, p. 1139–1146, 2016.
- GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.
- HAK, D. J. The biology of fracture healing in osteoporosis and in the presence of anti-

osteoporotic drugs. **Injury**, v. 49, n. 8, p. 1461–1465, 2018.

HE, Y.-X. et al. Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model. **Bone**, v. 48, n. 6, p. 1388–1400, 2011.

HERCULANO, R. D. et al. Natural Rubber Latex Used as Drug Delivery System in Guided Bone Regeneration (GBR). **Materials Research**, v. 12, n. 2, p. 253–256, 2009.

HISTING, T. et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. **Bone**, v. 49, p. 591–599, 2011.

JEONG, J. et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomaterials Research**, v. 23, p. 4–15, 2019.

JO, J. Y. et al. Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 7, p. 921–928, 2015.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 12, p. 1726–1733, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARLAMANGLA, A. S.; BURNETT-BOWIE, S.-A. M.; CRANDALL, C. J. Bone Health During the Menopause Transition and Beyond. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 695–708, 2018.

KATES, S. L.; ACKERT-BICKNELL, C. L. How do bisphosphonates affect fracture healing? **Injury**, v. 47, n. 01, p. S65–S68, 2016.

KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **European Journal of Cancer Care**, v. 26, n. 6, p. e12740, 2017.

KENKRE, J.; BASSETT, J. The bone remodelling cycle. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 55, n. 3, p. 308–327, 2018.

KIDO, H. W. et al. Porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) acid/biosilicate® composite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research -**

Part B Applied Biomaterials, v. 105, n. 1, p. 63–71, 2017.

KIKUCHI, M. et al. Development of Guided Bone Regeneration Membrane Composed of Beta-Tricalcium Phosphate and Poly (L-lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone) Composites. **Biomaterials**, v. 25, n. 28, 2004.

KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 287–294, 2015.

KUBO, T. et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 68, n. 5–6, p. 197–202, 1999.

LARSSON, S.; FAZZALARI, N. L. Anti-osteoporosis therapy and fracture healing. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 134, n. 2, p. 291–297, 2014.

LEE, J. et al. The incorporation of bFGF mediated by heparin into PCL/gelatin composite fiber meshes for guided bone regeneration. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 2, p. 146–159, 2015.

LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T. J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 55–61, 1997.

LIPS, P. Vitamin D physiology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 4–8, 2006.

LIU, H. et al. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 393–404, 2018.

LIU, W. et al. Alkaline biodegradable implants for osteoporotic bone defects—importance of microenvironment pH. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 1, p. 93–104, 2016.

LOOKER, A. C. et al. Trends in osteoporosis and low bone mass in older US adults, 2005–2006 through 2013–2014. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 6, p. 1979–1988, 2017.

MACEDO, A. P. et al. Influence of treadmill training on bone structure under osteometabolic alteration in rats subjected to high-fat diet. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 27, n. 2, p. 167–176, 2017.

MALHOTRA, A.; HABIBOVIC, P. Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications

and Advances for Bone Regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 983–992, 2016.

MARDAS, N. et al. Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. **Clinical Oral Implants Research**, v. 28, n. 3, p. 362–371, 2017.

MARINHO, C. G. et al. The burden of osteoporosis in Brazil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 5, p. 434–43, 2014.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551–555, 2011.

MATTSSON, P.; LARSSON, S. Calcium phosphate cement for augmentation did not improve results after internal fixation of displaced femoral neck fractures: A randomized study of 118 patients. **Acta Orthopaedica**, v. 77, n. 2, p. 251–256, 2006.

MELHUS, G. et al. Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rats. **Acta Orthopaedica**, v. 78, n. 3, p. 393–403, 2007.

MILLS, L. A.; AITKEN, S. A.; SIMPSON, A. H. R. W. The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. **Acta Orthopaedica**, v. 88, n. 4, p. 434–439, 2017.

MIRANDA, M. C. R. et al. Evaluation of peptides release using a natural rubber latex biomembrane as a carrier. **Amino Acids**, v. 50, n. 5, p. 503–511, 2018.

MIRANDA, M. C. R. **Avaliação da liberação sustentada da hidroxiapatita (HAp) associada a proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) empregando membranas de látex natural como suporte**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2018.

MORAES, R. C. N. et al. Estudo comparativo do desempenho de diferentes membranas oclusivas de látex natural no reparo ósseo. **Salusvita**, v. 31, n. 3, p. 213–228, 2012.

MRUE, F. et al. Evaluation of The Biocompatibility of a New Biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277–283, 2004.

NAOT, D.; MUSSON, D. S.; CORNISH, J. The Activity of Peptides of the Calcitonin Family in Bone. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 781–805, 2019.

NAUTH, A. et al. Use of Osteobiologics in the Management of Osteoporotic Fractures. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 25, p. S51–S55, 2011.

NISHIDA, T.; KUBOTA, S.; TAKIGAWA, M. The Role of Osteocytes in Bone Remodeling. **Clinical calcium**, v. 27, n. 12, p. 1697–1703, 2017.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 137, n. 1, p. 0108021, 2015.

OHEIM, R. et al. Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? **Injury**, v. 47, p. S3–S9, 2016.

OMAR, O. et al. Barrier membranes: More than the barrier effect? **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46, n. 21, p. 103–123, 2019.

PAIVA, K. B. S.; GRANJEIRO, J. M. Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 74–87, 2014.

PHAECHAMUD, T.; ISSARAYUNGYUEN, P.; PICHAYAKORN, W. Gentamicin sulfate-loaded porous natural rubber films for wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 634–644, 2016.

PINHO, E. C. C. M. et al. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 27–32, 2004.

PINTO, K. N. Z. et al. Scaffolds of bioactive glass-ceramic (Biosilicate ®) and bone healing: A biological evaluation in an experimental model of tibial bone defect in rats. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 29, n. 5, p. 665–683, 2018.

RAMALINGAM, S. et al. Guided bone regeneration in standardized calvarial defects using beta-tricalcium phosphate and collagen membrane: a real-time in vivo micro-computed tomographic experiment in rats. **Odontology**, v. 104, n. 2, p. 199–210, 2016.

REINWALD, S.; BURR, D. Review of Nonprimate, Large Animal Models for Osteoporosis Research. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 9, p. 1353–1368, 2008.

RETZEPI, M.; DONOS, N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 6, p. 567–576,

2010.

RIVARD, A. et al. Age-Dependent Impairment of Angiogenesis. **Circulation**, v. 99, n. 1, p. 111–120, 1999.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 455–498, 2006.

ROSA, N. et al. From mechanical stimulus to bone formation: A review. **Medical Engineering and Physics**, v. 37, p. 719–728, 2015.

ROSA, S. DE S. R. F. et al. Evidence in Practice of Tissue Healing with Latex Biomembrane: Integrative Review. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, p. 1–17, 2019.

RUPP, M. et al. Diaphyseal long bone nonunions — types, aetiology, economics, and treatment recommendations. **International Orthopaedics**, v. 42, n. 2, p. 247–258, 2018.

RUSSOW, G. et al. Anabolic Therapies in Osteoporosis and Bone Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 83–100, 2019.

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8037–8045, 1 set. 2013.

SANGHANI-KERALI, A. et al. Stem Cell Interventions for Bone Healing: Fractures and Osteoporosis. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 5, p. 369–377, 2018.

SANTOLINI, E.; WEST, R. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. **Injury**, v. 46, p. S8–S19, 2015.

SANTOS, M. L. et al. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, v. 30, n. 3, p. 29–35, 2005.

SCHLICKWEI, C. W. et al. Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5805–5830, 2019.

SEYEDMAJIDI, M. et al. Histopathological, histomorphometrical, and radiological evaluations of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as cell scaffolds in rat tibia: An in vivo study. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 2, p. 025015, 2018.

SHIELS, M. J.; MASTRO, A. M.; GAY, C. V. The effect of donor age on the sensitivity of osteoblasts to the proliferative effects of TGF β and 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$. **Life Sciences**, v. 70, n. 25, p. 2967–2975, 2002.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–245, 2016.

SOUZA, L. C. A. et al. Biomembrana de látex: novo método para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomias. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 3, p. 331–336, 2007.

SÖZEN, T.; ÖZİŞİK, L.; BAŞARAN, N. Ç. An overview and management of osteoporosis. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, p. 46–56, 2017.

STENDERUP, K. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, n. 6, p. 919–926, 2003.

SU, P. et al. Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2343–2361, 2018.

SUN, L. et al. FSH Directly Regulates Bone Mass. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 247–260, 2006.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 81, p. 715–736, 2012.

TERHEYDEN, H. et al. Osseointegration - communication of cells. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 10, p. 1127–1135, 2012.

THOMPSON, D. D. et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4, p. S125–S133, 1995.

THORMANN, U. et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. **Injury**, v. 45, n. 3, p. 487–493, 2014.

TURRI, A. et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. **Biomaterials**, v. 84, p. 167–183, 2016.

WRIGHT, N. C. et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. **Journal of bone and mineral research**, v. 29, n. 11, p. 2520–6, 2014.

WRONSKI, T. J.; CINTRÓN, M.; DANN, L. M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, v. 43, n. 3, p. 179–183, 1988.

XIAO, W. et al. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. **Frontiers of Oral Biology**, v. 18, p. 9–16, 2016.

YAMANAKA, J. S. **Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2020.

YANAGIHARA, G. R. **Análise tecidual e biomecânica de ossos de ratas ovariectomizadas alimentadas com ração hiperlipídica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

ZANCANELA, D. C. et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 576–582, 2019.

Apêndice

Apêndice A - Tabelas dos resultados estatísticos do peso animais.

Tabela 8: Peso corporal semanal

Grupo	Peso (g)*																
	1º Sem	2º Sem	3º Sem	4º Sem	5º Sem	6º Sem	7º Sem	8º Sem	9º Sem	10º Sem	11º Sem	12º Sem	13º Sem	14º Sem	15º Sem	16º Sem	17º Sem
SHAM	180 (7,29)	187,5 (7,76)	202,5 (8,43)	212,5 (7,56)	220 (7,53)	237,5 (8,43)	257,5 (11,93)	290 (9,04)	315 (10,84)	330 (9,54)	347,5 (6,78)	357,5 (7,04)	367,5 (8,86)	382,5 (9,26)	390 (9,80)	405 (9,91)	410 (6,55)
C	210 (11,34)	230 (15,81)	248,75 (15,53)	266,25 (18,85)	287,5 (25,63)	313,125 (30,81)	337,5 (37,51)	351,875 (44,07)	365,625 (47,09)	380 (47,96)	390 (41,75)	401,25 (39,71)	413,125 (39,09)	423,75 (37,11)	409,375 (41,96)	424,375 (38,49)	432,5 (35,15)
BTCP	200 (7,99)	210 (10,67)	260 (12,66)	282,5 (19,46)	302,5 (21,95)	317,5 (25,07)	332,5 (22,83)	347,5 (23,14)	357,5 (21,51)	362,5 (22,48)	375 (22,43)	382,5 (22,98)	392,5 (21,34)	410 (22,00)	382,5 (41,10)	387,5 (36,43)	402,5 (41,21)
L	185 (4,58)	202,5 (4,43)	240 (7,29)	277,5 (13,89)	300 (16,42)	312,5 (17,11)	335 (18,32)	342,5 (21,04)	355 (21,71)	367,5 (20,83)	377,5 (21,45)	387,5 (21,71)	405 (22,48)	410 (20,95)	382,5 (23,30)	397,5 (24,35)	410 (25,70)
BTCP+L	192,5 (10,35)	212,5 (11,16)	247,5 (18,70)	275 (24,92)	310 (21,95)	327,5 (17,88)	347,5 (19,35)	365 (18,52)	382,5 (17,88)	397,5 (16,42)	407,5 (14,74)	415 (16,78)	422,5 (17,73)	445 (16,69)	412,5 (21,38)	442,5 (22,00)	452,5 (20,35)
Grupo	P	<0,001															
Tempo	P	<0,001															
Grupo*Tempo	P	<0,001															

* Média e Desvio Padrão. ANOVA factorial com medidas repetidas E pós teste de Tukey com ajuste de Bonferroni.

Tabela 9: Diferenças estatísticas peso corporal semanal.

Grupo	Diferenças																
	1º Sem	2º Sem	3º Sem	4º Sem	5º Sem	6º Sem	7º Sem	8º Sem	9º Sem	10º Sem	11º Sem	12º Sem	13º Sem	14º Sem	15º Sem	16º Sem	17º Sem
SHAM	Aa	Ab	Ac	Ad	Ad	Ae	Af	Ag	Ah	Ai	Aj	Ak	Al	Am	Amn	An	Ao
C	Ca	Cb	Bc	Bd	Be	Bf	Bg	Bh	Bi	Bj	Bk	BCl	BCm	BCn	Aklmn	Amn	Amn
BTCP	BCa	Bb	Bc	Bd	Be	Bf	Bg	Bh	Bi	ABj	ABk	ABl	ABm	ABn	Aklmn	Amn	An
L	Aa	ABb	Bc	Bd	Be	Bf	Bg	Bh	Bi	Bj	ABk	BCl	BCm	ABCm	Ajklm	Aklm	Alm
BTCP+L	Aba	BCb	Bc	Bd	Be	Bf	Bg	Bh	Bi	Bj	Bk	Cl	Cm	Cn	Ajklmn	Amn	An

^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Apêndice B – Tabelas dos resultados estatísticos das análises de concentração de FSH, macroscopia das tíbias, densitometria óssea, ensaio mecânico, micro-ct, histologia e qPCR.

Tabela 10: Resultados FSH.

Grupo	FSH (ng/mL)*	Diferenças
SHAM	1,64 (0,67)	a
C	46,51 (13,27)	bc
BTCP	35,76 (24,84)	b
L	49,21 (14,10)	bc
BTCP+L	53,99 (22,15)	c
P*	<0,001	

*Média e Desvio Padrão, ANOVA um fator e pós teste de Tukey.

^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 11: Resultados para análise macroscópica das tíbias.

Grupo	Massa**	Comprimento*	Diferenças
SHAM	0,781 (0,720;0,838)	40,73 (0,91)	a
C	0,848 (0,812; 0,887)	42,37 (1,32)	ab
BTCP	0,834 (0,765; 0,941)	42,15 (1,32)	ab
L	0,843 (0,813; 0,883)	43,13 (1,14)	b
BTCP+L	0,791 (0,753; 0,886)	43,17 (0,65)	b
P	0,091	0,001	

**Mediana e intervalo de confiança, teste de Kruskal-Wallis e pós test de Dunn. *Média e Desvio Padrão, ANOVA um fator e pós teste de Tukey. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 12: Resultados densitometria óssea.

Grupo	DMO(g/cm ²)*	Diferenças	CMO (g)*	Diferenças
SHAM	0,178 (0,017)	a	0,013 (0,001)	a
C	0,113 (0,030)	b	0,008 (0,002)	b
BTCP	0,141 (0,027)	ab	0,012 (0,004)	ab
L	0,147 (0,031)	ab	0,011 (0,002)	ab
BTCP+L	0,137 (0,023)	ab	0,010 (0,002)	ab
P	0,001		0,009	

*Média e Desvio Padrão, ANOVA um fator e pós teste de Tukey. ^{ab} letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 13: Resultados ensaio mecânico.

Grupo	Força Máxima (N)*	Diferenças	Rigidez Relativa (N/mm)*
SHAM	121,32 (37,12)	a	138,46 (63,55)
C	83,63 (24,98)	b	96,30 (58,22)
BTCP	97,84(20,09)	ab	104,28 (25,38)
L	91,03 (21,10)	ab	156,50 (50,13)
BTCP+L	87,66 (27,09)	ab	99,29 (32,47)
P	0,047		0,084

* Média e Desvio Padrão, ANOVA um fator e pós teste de Tukey. ^{ab} letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 14: Resultados micro-Ct para os valores de BV/TV e Tb.Th.

Grupo	BV/TV (%)**	Tb.Th (mm)**
SHAM	42,34 (32,17; 59,24)	0,15 (0,11; 0,19)
C	27,01 (13,02; 50,31)	0,15 (0,11; 0,20)
BTCP	27,07 (20,92; 40,88)	0,11 (0,08; 0,18)
L	39,93 (29,57; 50,85)	0,20 (0,16; 0,24)
BTCP+L	27,39 (12,52; 44,65)	0,14 (0,09; 0,18)
P	0,150	0,093

**Mediana e intervalo de confiança, teste de Kruskal-Wallis e pós test de Dunn.

Tabela 15: Resultados micro-Ct para os valores de Tb.N e Tb.Sp.

Grupo	**Tb.N (1/mm)*	Diferenças	**Tb.Sp (mm)	Diferenças
SHAM	2,90 (2,46; 3,56)	a	0,16 (0,13; 0,20)	a
C	2,90 (2,46; 3,56)	a	0,16 (0,13; 0,20)	a
BTCP	2,31 (1,86; 3,05)	ab	0,24 (0,18; 0,29)	ab
L	1,99 (1,79; 2,24)	b	0,30 (0,22; 0,34)	ab
BTCP+L	2,11 (1,26; 2,83)	ab	0,29 (0,22; 0,36)	b
P	0,016		0,026	

**Mediana e intervalo de confiança, teste de Kruskal-Wallis e pós test de Dunn. ^{ab} letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos

Tabela 16: Resultados histologia.

Grupo	B.Ar/Tt.Ar (%)**	Diferenças	Co.Ar/Tt.Ar	Diferenças
SHAM	58,28 (44,99; 74,61)	a	60,17 (44,52; 76,15)	a
C	28,68 (26,28; 30,82)	ab	31,07 (21,41; 38,94)	ab
BTCP	46,70 (32,19; 55,66)	b	42,35 (30,20; 30,20)	b
L	30,18 (13,26; 58,17)	ab	35,56 (13,51; 64,44)	ab
BTCP+L	33,99 (21,83; 48,267)	ab	39,32 (23,57; 66,36)	ab
p	0,017		0,026	

**Mediana e intervalo de confiança, teste de Kruskal-Wallis e pós test de Dunn. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos

Tabela 17: Resultados qPCR

Grupo	OC	MMP9	OPG	RANKL
SHAM	0,962 (0,542; 1,320)	0,834 (0,294; 0,638)	0,578 (0,303; 0,987)	0,724 (0,514; 0,873)
C	1,013 (0,144; 2,153)	1,018 (0,181; 2,051)	1,153 (-0,309; ,862)	1,066 (0,201; 2,099)
BTCP	1,017 (0,321; 2,579)	1,364 (0,311; 2,247)	0,899 (-0,053; 1,958)	1,173 (-0,471; 3,747)
L	1,509 (0,097; 3,319)	0,853 (0,853; 2,048)	0,889 (0,206; 1,566)	0,987 (-0,039; 2,341)
BTCP+L	1,615 (0,011; 4,093)	1,307 (0,1264; 3,655)	1,088 (0,375; 1,819)	2,022 (0,404; 3,835)
p	0,469	0,710	0,241	0,770

**Mediana e intervalo de confiança, teste de Kruskal-Wallis e pós test de Dunn.