UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

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

MARIANA MALOSTE BUTEZLOFF

**O USO DO ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE, PARATORMÔNIO OU
ALENDRONATO DE SÓDIO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DO FÊMUR
DE RATOS COM LESÃO MEDULAR**

Ribeirão Preto

2018

MARIANA MALOSTE BUTEZLOFF

“O uso do ultrassom de baixa intensidade, paratormônio ou alendronato de sódio na consolidação de fraturas do fêmur de ratos com lesão medular.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Batista Volpon

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Butezloff, Mariana Maloste

O uso do ultrassom de baixa intensidade, paratormônio ou alendronato de sódio na consolidação de fraturas do fêmur de ratos com lesão medular. Ribeirão Preto, 2018.

XX f.:134 Il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Paraplegia. 2. Tecido Ósseo. 3. Consolidação da fratura. 4. Terapia por ultrassom. 5. Paratormônio. 6. Alendronato de sódio

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Maloste Butezloff

“O uso do ultrassom de baixa intensidade, paratormônio ou alendronato de sódio na consolidação de fraturas do fêmur de ratos com lesão medular”.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus por ter me encaminhado nas escolhas corretas, e pela
força concedida para trilhar o meu
caminho e chegar onde estou.

Aos meus Pais Carlos e Roseli, por sempre terem me
encorajado nas escolhas e por me criarem
e me ensinarem a ser o que sou.

Ao meu irmão Thiago, por sempre estar ao meu lado e me
mostrar que a irmandade é uma amizade
acima de tudo.

Ao meu noivo Juliano, por ter se tornado meu apoio e
discernimento nas horas difíceis e por
sempre me motivar e mostrar a
positividade da vida.

Dedico este trabalho

Agradecimientos

Ao **Prof. Dr. José Batista Volpon**, meu orientador, por todo apoio durante a pós-graduação, por todos ensinamentos e aprendizado dedicado durante todos esses anos. Pelos incentivos e encorajamentos nas horas difíceis. Pelas inspirações ao longo desses anos e incentivo de que mesmo com muitos obstáculos não podemos deixar de sonhar e irmos em busca do que queremos. E que o mais importante é sempre passarmos o conhecimento adiante.

Ao **Prof. Dr. Vitor Correlo**, coorientador durante o período de doutorado sanduíche realizado no laboratório 3B's Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics da Universidade do Minho - Portugal. Pelo acolhimento e acompanhamento durante um período de experiência enriquecedora, por me ajudar a ver a pesquisa de um modo humano e dedicado.

À **Ariane Zamarioli**, coorientadora e amiga pela ajuda durante as escolhas e definições desse projeto. Por toda ajuda e ensinamentos dispensados durante todos os anos de pós-graduação. Pela parceria na vida e na profissão e pela inspiração de sempre fazer o melhor para a pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Riberto** e **Prof. Dr. Marcelo Nogueira Barbosa**, Coordenadores do Programa de Pós-graduação durante o período de doutorado.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano** pelo auxílio e discussões na realização dos ensaios mecânicos.

Ao **Prof. Dr. Rui Reis** pela disponibilidade do Laboratório 3B's Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics da Universidade do Minho-Portugal para realização das análises microtomográficas.

Aos amigos todos que a vida me permitiu agregar durante todos esses anos, pelo companheirismo, parceria, irmandade e suporte nas horas fáceis e difíceis durante todos os anos de pós-graduação.

Às amigas do Laboratório, **Patricia Sangregori**, **Iara Botega**, **Paula Guimarães**, **Jéssica Suzuki**, **Bruna Leonel**, **Brígida Brancaleon**, **Marcela Paiva**, **Aline**, **Suelen Mariano** pela parceria e auxílio durante todos os dias e por tornarem o dia a dia mais leve.

Às amigas e parceiras **Roberta Shimano e Gabriela Yanagihara** pelas ajudas nas horas difíceis, pelas experiências vividas durante o doutorado sanduíche e principalmente pelo aprendizado, além da amizade.

Aos funcionários do laboratório **Teresinha, Luís Henrique, Moro e Reginaldo**, pela ajuda durante o período da pós-graduação.

À funcionária **Ana Paula Macedo** pela prontidão em ajudar e pelos ensinamentos.

Aos funcionários da FORP **Nilza Letícia, Marco Antônio e Fátima** por toda ajuda na realização das análises realizadas no laboratório de Pediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Ao funcionário e amigo **Francisco** pela ajuda em todas as horas e conversas necessárias.

À secretária do Programa de Pós-graduação, **Rita** pela ajuda durante todo esse tempo na pós-graduação.

Aos colegas de Programa que, de uma forma ou outra, estiveram presentes durante esse período.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado e pela bolsa **PDSE** para doutorado sanduíche.

À concessão de bolsa de doutorado regular, processo nº 2016/13026-6, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**). E a concessão do auxílio financeiro do projeto, processo nº 2015/22126-1, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**).

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta pesquisa.

Resumo

RESUMO

BUTEZLOFF, M. M. **O uso do ultrassom de baixa intensidade, paratormônio ou alendronato de sódio na consolidação de fraturas do fêmur de ratos com lesão medular.** 2018. 140 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Fundamento: Fratura é ocorrência frequente em lesados medulares, em virtude da acentuada osteoporose, o que compromete o esqueleto como um todo e a consolidação óssea da fratura, em particular, o que resulta em calo ósseo de má qualidade, ou mesmo surgirem anomalias de consolidação. Assim, são importantes a busca e a avaliação de intervenções terapêuticas que possam melhorar o reparo ósseo nessa população. **Objetivo:** Avaliar os resultados da administração de alendronato de sódio, paratormônio e ultrassom de baixa intensidade na qualidade do calo ósseo de fraturas diafisárias do fêmur de ratos previamente submetidos à lesão medular. **Material e Métodos:** 75 ratos machos foram distribuídos em 05 grupos (n=15): (1) CON: ratos normais submetidos à fratura do fêmur; (2) LM: ratos com lesão medular e fratura; (3) LM+ALE: ratos com lesão medular, fratura e tratamento com alendronato de sódio; (4) LM+PTH: ratos com lesão medular, fratura e tratamento com paratormônio e (5) LM+US: ratos com lesão medular, fratura e tratamento com ultrassom. A medula espinhal foi completamente seccionada no nível da décima vértebra torácica (T10). No grupo controle (Sham) a medula foi apenas exposta, mas não seccionada. A fratura do fêmur foi realizada 10 dias após a produção da lesão medular. Sua localização foi na diáfise femoral, seguida de fixação com fio de aço no canal medular. A terapêutica em cada grupo foi aplicada durante as duas semanas seguintes à fratura. A avaliação da qualidade óssea e do calo foi feita por imagens de DEXA, microtomografia computadorizada (μ CT), histologia, histomorfometria, imunoistoquímica (OPG, RANK e RANKL), resistência mecânica, PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica e ELISA (OPG e IGF-1). **Resultados:** A lesão medular afetou gravemente a qualidade óssea com deterioração da microarquitetura óssea e redução da densidade mineral óssea, além de prejuízo da resistência mecânica. Houve redução da expressão dos genes de formação óssea e aumento da reabsorção, com alteração fenotípica. O processo de consolidação ocorreu predominantemente por ossificação intramembranosa nos animais paraplégicos. No entanto, a qualidade do calo foi pobre, em relação aos animais que não sofrem a lesão. Por outro lado, o uso de recursos terapêuticos como o alendronato de sódio, paratormônio e ultrassom de baixa intensidade foi capaz de recuperar muitas das propriedades microarquiteturais, celulares e mecânicas do osso não fraturado. De forma semelhante, os

recursos farmacológicos e mecânico utilizados neste estudo atuaram positivamente no processo de consolidação uma vez que houve aumento na densidade do calo, melhora da sua microarquitetura, e atividade celular, além do aumento na resistência aos esforços mecânicos. Em resumo, a lesão medular causou grave deterioração do tecido ósseo e modificações no processo de consolidação que, foram amenizadas e até normalizadas pela administração de alendronato de sódio, paratormônio e ultrassom. **Conclusão:** Os recursos terapêuticos acima citados foram benéficos para a recuperação do tecido ósseo intacto e para melhorar a qualidade do calo ósseo, após a deterioração causada pela lesão medular.

Palavras-chave: Paraplegia, Tecido ósseo, Consolidação da fratura, Terapia por ultrassom, Paratormônio, Alendronato de sódio.

Abstract

ABSTRACT

BUTEZLOFF, M. M.   **The use of ultrasound of low intensity, parathyroid hormone or alendronate sodium in bone healing of femoral fractures in spinal cord injured rats.** 2018. 140 f. Thesis (Ph. Degree) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto of the University of Sao Paulo.

Background: Bone fracture is a frequent event in individuals with spinal cord injury (SCI) as a consequence of the marked reduction in bone mass and quality. SCI-induced bone loss may also induce changes in bone healing, leading to a poor callus formation and even non-unions. Therefore, the search for therapeutic interventions that may improve bone healing in this particular population may have a remarkable clinical importance. **Purpose:** To evaluate the influence of sodium alendronate, parathyroid hormone and low intensity ultrasound on the quality of fracture bone callus formation in SCI rats. **Material and Methods:** 75 male Wistar rats were randomly divided into five groups (n=15) (1) CON: control rats subjected to fracture, but not to spinal cord injury; (2) SCI: spinal cord injured rats and femur bone fracture; (3) SCI+ALE: spinal cord injured rats with bone fracture and treatment with sodium alendronate; (4) SCI+PTH: spinal cord injured rats with bone fracture and treatment with parathyroid hormone, and (5) SCI+LIPUS: spinal cord injured rats with bone fracture and treatment with low intensity ultrasound. A complete transection of the spinal cord was performed at the T10 level. In the control group the spinal cord was exposed but not sectioned. At 10 days post-injury (or Sham) a bone fracture was produced at the femoral shaft and fixed with an intramedullary pin. The ALE and PTH treatments began on day 1, and US began on day 3, after fracture and on day 14 all rats were euthanized. Non-fractured tibias and femur bone callus were analyzed by DXA, micro-computed tomography (μ CT), histology, histomorphometry, immunohistochemistry (OPG, RANK and RANKL), mechanical test, real time PCR and ELISA (OPG and IGF-1). **Results:** SCI significantly impaired the bone quality, downregulated the osteoblastic-related gene expression and increased bone resorption, resulting in several phenotypic changes. SCI deteriorated the microarchitecture, reduced bone mass and weakened bone strength. Bone healing in SCI occurred predominantly by intramembranous ossification, leading to a poor callus formation. Conversely, the administration of alendronate, PTH and LIPUS were effective at ameliorating and even fully reestablish the bone microarchitecture, cells activity and mechanical strength. Similarly, both the pharmacological and mechanical therapeutics analyzed in this study were potentially efficient to increase bone callus density, to improve callus microstructure and metabolism, and to increase newly bone strength. In short,

we revealed that SCI induced severe bone deterioration and changes in bone healing, which were ameliorated and even fully restored by the administration of alendronate, PTH, LIPUS and passive standing. **Conclusions:** The therapeutic approaches used in this study had great efficacy in restoring non-fractured bone integrity and with improvement of bone callus in paraplegic rats.

Keywords: Paraplegia, Bone tissue, Bone healing, Ultrasound therapy, Parathyroid hormone, Sodium alendronate.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Alavanca desenvolvida para produção da fratura da diáfise femoral. O equipamento possui uma alavanca acionadora, baixa uma lâmina romba. A coxa do animal foi firmemente fixada entre os suportes metálicos e o braço da alavanca foi abaixado até a ocorrência da fratura.....46
- Figura 2. Acompanhamento radiográfico. Imagem radiográfica obtida imediatamente após a fratura; 7 dias após a fratura e 14 dias após a fratura. Com o acompanhamento semanal foi possível observar o posicionamento correto do fio e adequação da fratura 48
- Figura 3. Ilustração da aplicação do ultrassom. O cabeçote do transdutor foi colocado sobre a região da fratura acoplado à pele com gel condutor interposto, e associado a pequenos movimentos circulares para assegurar que toda a fratura fosse rastreada 49
- Figura 4. Figura ilustrativa da seleção da região trabecular de interesse na região proximal da tibia a ser analisada pelo micro-CT 50
- Figura 5. Figura ilustrativa da delimitação da região diafisária de interesse para análise pelo micro-CT 51
- Figura 6. Figura ilustrativa da região de interesse correspondente ao calo ósseo destacada em vermelho, a ser analisada pelo micro-CT 52
- Figura 7. Ilustração do posicionamento dos ossos para realização do exame de densitometria. A fileira superior corresponde aos fêmures e a inferior às tíbias 53
- Figura 8. Ilustração do ensaio mecânico. (A) Ilustrações do ensaio mecânico de três pontos realizado na diáfise da tibia. O osso ficou apoiado em suportes metálicos e a parte móvel da máquina exerce força vertical. (B) Ensaio mecânico de torção no fêmur, com as duas extremidades incluídas em resina acrílica. A extremidade proximal do espécime ficou fixa (3) e a rotação foi aplicada na extremidade distal (1), com o calo ósseo interposto (2) ..54
- Figura 9. Secções histológicas coradas com tricrômico de Masson. (A) Fotomicrografia da área de seleção do osso trabecular. (B) Fotomicrografia do corte histológico da metáfise proximal da tibia para identificação do tecido ósseo trabecular selecionado em verde a partir da demarcação dos tons de azul, com exclusão da área que representa a cartilagem de crescimento da tibia (asterisco). Aumento 50x.....55
- Figura 10. Cortes histológicos corados com *picro-sirius red* e iluminados com luz polarizada e birrefringência para estudo do colágeno tanto do calo ósseo (A e B) como do osso intacto (C e D). (A) área de seleção do calo ósseo. (B) calo com identificação das fibras colágenas, expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado. (C) área de seleção da metáfise proximal da tibia, adjacente ao disco epifisário. (D) metáfise proximal da tibia, identificando as fibras colágenas, expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado. Nas imagens (B e D) as fibras colágenas tipo I (coradas em vermelho e alaranjado) foram selecionadas e marcadas pelo software utilizando a cor verde e as fibras tipo III (coradas em verde e amarela) foram marcadas na cor vermelha, para diferenciação dos tipos de fibra I e III, e para que a quantificação das fibras fosse possível. Aumento de 50x 56
- Figura 11. Secções histológicas coradas pelo TRAP em que os osteoclastos aparecem em vermelho. (A) Calo ósseo. (B) Mesma área que "A", com os osteoclastos marcados em verde. (C) Metáfise proximal da tibia. (D) Mesma área que em "C" com osteoclastos em verde. A cartilagem epifisária (*) não apresenta marcações em verde, pois não apresenta osteoclastos, logo a área não sofre reabsorção. Aumento de 100x.....57
- Figura 12. Secções histológicas coradas por imunomarcagem das proteínas selecionadas RANK, RANKL e OPG que aparecem na cor acastanhada, na neoformação óssea do calo (A) e no

tecido trabecular da tíbia (C). (B) Mesmo corte que "A" com marcação em verde para identificação das proteínas selecionadas (RANK, RANKL e OPG). (D) Corte imunoistoquímico da metáfise proximal da tíbia, marcada em verde para identificação da imunomarcação das proteínas selecionadas (RANK, RANKL e OPG). Aumento de 200x	58
Figura 13. Ilustração das complicações decorrentes da lesão medular. A - Trombose; B - lesão cutânea por pressão; C - bexigoma sanguinolento ; D - distensão de alça intestinal; E - autofagia na região do joelho; F - automutilação nas patas.....	64
Figura 14. Evolução da massa corpórea em todos os grupos nos dias 0 (início do experimento e produção da lesão medular), 10 (realização fratura) e 24 (14 dias após fratura e na eutanásia). No início do experimento (dia 0) não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Nos dias 10 e 24 foi possível observar que os animais controle ganharam mais massa corpórea que os animais paraplégicos ($p<0,05$). Os tratamentos a que animais paraplégicos foram submetidos não alteraram o ganho de massa ($p>0,05$)	65
Figura 15. Acompanhamento radiográfico para confirmar a adequação da fratura e redução nos tempos: imediatamente (PO 0), primeira semana (PO 7) e segunda semana (PO 14) após a fratura. Ratos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE), ultrassom (LM+US) e paratormônio (LM+PTH)	66
Figura 16. Densidade mineral óssea (DMO) nos grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE), ultrassom (LM+US) e paratormônio (LM+PTH) na tíbia direita. Houve redução da DMO nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que os tratamentos com alendronato e paratormônio foram eficazes na reversão da perda, mas não o ultrassom. ^a $p<0,05$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM; ^c $p<0,05$ versus LM+ALE; ^d $p<0,05$ versus LM+PTH	68
Figura 17. Conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE), ultrassom (LM+US) e paratormônio (LM+PTH) na tíbia direita. Houve redução da CMO nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que os tratamentos com alendronato e paratormônio reverteram essa perda, mas não o ultrassom. ^a $p<0,05$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM; ^c $p<0,05$ versus LM+ALE; ^d $p<0,05$ versus LM+PTH	68
Figura 18. Densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e área do calo ósseo nos vários grupos. Houve redução da DMO nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que o tratamento com alendronato reverteu essa perda de densidade óssea. ^a $p<0,05$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM. Apesar do conteúdo mineral ósseo ser menor nos animais paraplégicos e os tratamentos melhorarem essa condição não houve diferença significativa entre os grupos. A área do calo foi maior em todos os grupos lesados medulares, mas não houve significância estatística ($p>0,05$).....	69
Figura 19: Imagens tridimensionais da microarquitetura trabecular da metáfise tibial. Há redução expressiva do osso trabecular nos ratos paraplégicos sem tratamento (LM) em comparação com o controle. Essas alterações foram amenizadas pelos tratamentos com alendronato de sódio, ultrassom e paratormônio	69
Figura 20: Imagens ilustrativas tridimensionais da microarquitetura da córtex da diáfise tibial. Houve deterioração óssea nos ratos paraplégicos em relação ao controle, bem como efeito positivo das terapêuticas no tecido da córtex	70
Figura 21: Imagens dos calos ósseos obtidas pela μ CT, tanto no plano sagital, como transversal. A ilustração mostra que a lesão medular induziu poucas alterações na neoformação óssea, mas os tratamentos propostos causaram melhora na qualidade do calo ósseo externo, que apresentaram maior volume e mineralização	72

- Figura 22: Cortes histológicos coronais da metáfise proximal de tíbias coradas em HE em animais representativos de cada grupo. O controle (CON) mostra a cartilagem de crescimento com seu arranjo colunar típico. A região adjacente está formada por trabéculas de osso jovem e a porção mais inferior da figura ilustra o predomínio de medula óssea nos espaços inter trabeculares. Na figura no lesado medular (LM) chama a atenção a grande falha óssea central, com desaparecimento de tecido ósseo. No tratamento com alendronato a porção metafisária está densamente preenchida por osso trabecular. O ultrassom (LM+US) causou aumento do trabeculado metafisário, mas que não se igualou ao controle, além do trabeculado ser mais fino e menos organizado. No tratamento com paratormônio (LM+PTH) há trabeculado de boa qualidade, principalmente na região mais próxima da placa de crescimento. Coloração em HE e aumento de 50x..... 73
- Figura 23: Cortes histológicos coronais da metáfise proximal de tíbias coradas com TRAP. Houve aumento importante na atividade osteoclástica nos animais paraplégicos, e redução naqueles tratados com paratormônio. Aumento de 50x 74
- Figura 24: Cortes histológicos da metáfise proximal de tíbias coradas com *picro-sirius red*. Houve redução importante na deposição de colágeno nos animais paraplégicos. Os tratamentos, por outro lado, aumentaram a deposição de colágeno, principalmente no grupo alendronato. Aumento de 50x 74
- Figura 25. Cortes histológicos da metáfise das tíbias dos animais dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento corados com tricrômico de Masson, *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) e *picro-sirius red* (PICRO) respectivamente nos aumentos de 50x, 100x e 50x. Foi observado que a lesão medular afetou significativamente a qualidade do tecido ósseo intacto, porém a terapêutica utilizada foi capaz de reverter essa condição. A lesão medular aumentou a presença de osteoclastos e os tratamentos foram capazes de reduzi-la. O colágeno foi reduzido nos grupos com lesão medular, mas o PTH aumentou o depósito de ambos os tipos de colágeno 76
- Figura 26: Imagens histológicas dos calos ósseos dos animais dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento. Os retângulos representam áreas com maior aumento. No controle predomina o calo ósseo externo formado por tecido ósseo jovem e áreas cartilaginosas. Nos lesados medulares (LM) há predomínio de tecido ósseo e menor área cartilaginosa. Entre os animais tratados há união sólida entre os fragmentos e tecido ósseo jovem. Coloração em HE, aumento de 12,5; 50 e 200 x..... 78
- Figura 27: Cortes histológicos no plano coronal dos calos ósseos com coloração TRAP. A coloração avermelhada indica aumento na quantidade de osteoclastos no calo ósseo dos animais do grupo LM em comparação com os demais grupos. Aumento de 12,5 x..... 79
- Figura 28: Cortes histológicos dos calos ósseos dos animais dos diferentes grupos. A intensidade da coloração alaranjada indica aumento na deposição de colágeno, que está reduzida nos calos ósseos dos animais paraplégicos sem tratamento em relação aos outros grupos. *Picro-sirius red* e aumento de 12,5 x..... 79
- Figura 29. Ilustra os cortes histológicos do calo ósseo dos animais dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento corados com *picro-sirius red* (PICRO) e *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP), respectivamente (50x e 100x, respectivamente). A luz polarizada foi utilizada para coloração em *picro-sirius red*..... 80
- Figura 30. Imagem qualitativa da metáfise proximal da tíbia dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento (LM+ALE, LM+US e LM+PTH), marcados por imunomarcagem das proteínas osteoprotegerina (OPG), fator nuclear kappa β (RANK) e ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β (RANKL). As setas representam a expressão das proteínas. Aumento de 200x 82

- Figura 31. Cortes histológicos do calo ósseo de todos os grupos. Expressão por imunomarcção das proteínas osteoprotegerina (OPG), fator nuclear kappa β (RANK) e ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β (RANKL). As setas representam a expressão das proteínas. Aumento de 200x 84
- Figura 32. Força máxima e rigidez apresentada nos grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados (LM+ALE, LM+PTH e LM+US). A lesão medular causou redução na força máxima e na rigidez óssea nos animais paraplégicos não tratados. Os tratamentos com alendronato e ultrassom foram eficazes em reverter essa perda. ^ap<0,05 versus CON; ^bp<0,05 versus LM; ^cp<0,05 versus LM+ALE 86
- Figura 33. Calo ósseo. Comparação do torque, rigidez, e ângulo de ruptura entre os grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE) e ultrassom (LM+US). Houve redução no torque e no ângulo de ruptura nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que os tratamentos com alendronato e ultrassom melhoraram esses parâmetros. ^ap<0,05 versus CON; ^{a'}p=0,07 versus CON; ^bp<0,05 versus LM..... 86
- Figura 34. Expressão gênica da formação óssea na tíbia. Comparação da expressão da média normalizada dos genes *Col1a* (Colágeno tipo 1 alfa), *OSX* (*Osterix* -Fator de transcrição Sp7) e *Runx2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica), entre os grupos CON, LM, LM+ALE e LM+US no tecido ósseo intacto da tíbia. Estes genes foram normalizados com o gene endógeno GaPDH. ^ap<0.05 versus CON, ^bp<0.05 versus LM 87
- Figura 35. Expressão gênica dos genes de formação no calo ósseo. Comparação da expressão da média normalizada dos genes *Col1a* (Colágeno tipo 1 alfa), *OSX* (*Osterix* -Fator de transcrição Sp7) e *Runx2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica), entre os grupos. Estes genes foram normalizados com o gene endógeno GaPDH. ^ap<0.05 versus CON 88

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Agrupamento dos ratos conforme o tratamento recebido.....	44
Quadro 2. Resumo das metodologias e as avaliações utilizadas	61
Quadro 3. Total de animais incluídos e excluídos, com as causas, em cada grupo.....	63

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Medidas macroscópicas da tíbia direita, intacta sem fratura (CON, LM, LM+ALE, LM+US e LM+PTH).....	67
Tabela 2- Microarquitetura óssea trabecular. Os resultados confirmam os achados qualitativos da figura anterior. Houve deterioração do tecido trabecular dos animais paraplégicos quando comparados aos animais controle. A lesão medular induziu reduções significativas no BV, BV/TV, Tb.N e aumento na Tb.Sp. Os tratamentos com alendronato de sódio e paratormônio foram eficazes em minimizar essas reduções e até reverter as perdas, aproximando-se dos ratos normais	70
Tabela 3- Análise quantitativa da microestrutura do osso cortical. Os resultados confirmam os achados qualitativos da figura anterior, em que é possível observar importante redução de tecido cortical nos animais paraplégicos. Os tratamentos foram eficazes em minimizar essas reduções e até reverter as perdas, aproximando-se de ratos normais.....	71
Tabela 4- Análise quantitativa da microarquitetura do calo ósseo no controle e os vários tipos de tratamento	72
Tabela 5- Histomorfometria da metáfise proximal da tíbia, área reabsortiva (TRAP), formação óssea (Masson), formação de colágeno tipo I (Coll_1), tipo III (Coll_3) e colágeno total (Coll_total) nos grupos controle (CON), lesado medular (LM) e lesados medulares tratados (LM+ALE, LM+PTH, LM+US).....	77
Tabela 6- Histomorfometria do calo ósseo, área reabsortiva (TRAP), formação óssea (Masson), deposição de colágeno tipo I (Coll_1), tipo III (Coll_3) e colágeno total (Coll_total) nos grupos controle (CON), lesado medular (LM) e lesados medulares tratados (LM+ALE, LM+PTH, LM+US).....	81
Tabela 7- Valores médios e desvio padrão dos resultados quantitativos da imunoistoquímica da metáfise proximal da tíbia dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento (LM+ALE, LM+US e LM+PTH)	83
Tabela 8- Resultados da imunoistoquímica do calo ósseo em todos os grupos	85
Tabela 9- Resultados bioquímico por ensaio de imunoabsorção enzimática em todos os grupos	88

Lista de Abreviaturas,
Siglas, Símbolos e
Unidades

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

FMRP/USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
LM	Lesão medular
CON	Controle
FRAT	Fratura
ALE	Alendronato de sódio
LM+ALE	Lesado medular com fratura óssea e tratado com alendronato de sódio
PTH	Paratormônio
LM+PTH	Lesado medular com fratura óssea e tratado com paratormônio
US	Ultrassom de baixa intensidade
LM+US	Lesado medular com fratura óssea e tratado com ultrassom de baixa intensidade
DMO	Densidade mineral óssea
CMO	Conteúdo mineral ósseo
TV	Volume total
BV/TV	Volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas
BS/BV	Superfície óssea
Po	Porosidade
Tb.N	Número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido ósseo
Tb.Th	Espessuras das trabéculas ósseas
Tb.Sp	Espaçamento entre as trabéculas ósseas
Conn.D	Densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas
TMD	Densidade mineral trabecular
Ct.V	Volume total do osso cortical
Ct.BV/TV	Volume ocupado pelo osso cortical, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume total
Ct.Th	Espessura cortical
D	Direito
E	Esquerdo
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
FM	Força Máxima

R	Resistência
μL	Microlitro
μm	Micrometro
kg	Kilograma
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kilograma
μg	Micrograma
μg/kg	Micrograma por kilograma
L	Litro
mL	Mililitro
pg/mL	Picograma por mililitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
N	Newton
N.mm	Newton.milímetro
N.m	Newton.metro
N.mm/deg	Newton.milímetro/grau
Deg	Graus
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
mW/cm ²	Miliwats por centímetro quadrado
μs	Microsegundo
kV	Quilovolt
V	Volt
<i>g</i>	Unidade de aceleração
Coll1A	Colagenase
Osx	Osterix
Runx2	Fator 2 de transcrição
OPG	Osteoprotegerina
RANK	Fator nuclear kappa β
RANKL	Ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β
IGF-1	Fator de crescimento tipo insulina I

Sumário

SUMÁRIO¹

1	INTRODUÇÃO	32
1.1	Tecido ósseo	32
1.2	Osteopenia e osteoporose decorrentes da lesão medular	33
1.3	Reparo ósseo normal	34
1.4	Consequências da consolidação da fratura em ossos osteopênicos	35
1.5	Prevenção ou restauração da qualidade do tecido e calo ósseo	36
1.5.1	<i>Bisfosfonatos</i>	37
1.5.2	<i>Paratormônio</i>	37
1.5.3	<i>Ultrassom de baixa intensidade</i>	38
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL	43
3.1	Animais	43
3.2	Grupos experimentais.....	44
3.3	Procedimento experimental – indução cirúrgica da osteoporose por lesão medular.....	45
3.4	Procedimento experimental – fratura óssea	45
3.5	Administração do alendronato de sódio	48
3.6	Administração do PTH.....	48
3.7	Aplicação do ultrassom de baixa intensidade.....	48
3.8	Análises da estrutura óssea	49
3.8.1	<i>Medidas macroscópicas da tíbia</i>	49
3.8.2	<i>Microtomografia computadorizada (micro-CT)</i>	49
3.8.2.1	Análise da microarquitetura do osso trabecular.....	50
3.8.2.2	Análise da microarquitetura do osso cortical	51
3.8.2.3	Análise da microarquitetura do calo ósseo	51
3.8.3	<i>Densitometria óssea</i>	52
3.8.4	<i>Análise mecânica</i>	53
3.8.5	<i>Microscopia óptica</i>	54
3.8.5.1	Quantificação histológica do osso trabecular	55

---

¹ Normas de acordo com as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico impresso São Paulo, 2016.

3.8.5.2	Quantificação do colágeno.....	55
3.8.5.3	Quantificação de osteoclastos.....	56
3.8.6	<i>Imunoistoquímica</i>.....	57
3.8.7	<i>Análise molecular</i>.....	59
3.8.7.1	Extração e Quantificação do RNA.....	59
3.8.7.2	Síntese do cDNA	59
3.8.7.3	Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA).....	59
3.8.7.4	Cálculo da Expressão Relativa do Gene.....	60
3.9	Análise sérica dos marcadores de formação e reabsorção óssea	60
3.10	Análise estatística dos resultados	60
4	RESULTADOS	63
4.1	Perda animal decorrente da lesão medular	63
4.1.1	<i>Complicações decorrentes da lesão medular .....</i>	<i>64</i>
4.2	Perda animal decorrente da produção da fratura	64
4.3	Acompanhamento da massa corpórea	65
4.4	Acompanhamento radiográfico	65
4.5	Medidas macroscópica da tíbia: massa, comprimento e perímetro	67
4.6	Análise densitométrica da tíbia e do calo ósseo.....	67
4.7	Análise qualitativa e quantitativa da microarquitetura óssea (micro-CT)	69
4.7.1	<i>Análise qualitativa e quantitativa da microarquitetura trabecular .....</i>	<i>69</i>
4.7.2	<i>Análise qualitativa e quantitativa da microarquitetura do osso cortical.....</i>	<i>70</i>
4.7.3	<i>Microarquitetura do calo ósseo.....</i>	<i>71</i>
4.8	Análise de histologia óssea	72
4.8.1	<i>Histologia descritiva da metáfise proximal da tíbia .....</i>	<i>72</i>
4.8.1.1	Quantificação histológica na tíbia.....	75
4.8.2	<i>Histologia descritiva do calo ósseo.....</i>	<i>77</i>
4.8.2.1	Histomorfometria do calo ósseo	80
4.9	Imunoistoquímica óssea	81
4.9.1	<i>Imunomarcadores de RANK, RANKL e OPG na metáfise proximal da tíbia</i>	<i>81</i>
4.9.2	<i>Imunomarcadores de RANK, RANKL e OPG no calo ósseo do fêmur.....</i>	<i>83</i>
4.10	Resistência Mecânica	85
4.10.1	<i>Análise mecânica de rigidez e força máxima da tíbia .....</i>	<i>85</i>
4.10.2	<i>Resistência mecânica do calo ósseo .....</i>	<i>86</i>
4.11	Análise da expressão gênica óssea.....	87
4.11.1	<i>Expressão dos genes de formação na tíbia .....</i>	<i>87</i>

4.11.2	<i>Expressão dos genes de formação do calo ósseo</i>	87
4.12	Expressão sérica dos marcadores de formação pelo método Elisa.....	88
5	DISCUSSÃO	90
5.1	Alterações na qualidade e no processo de consolidação decorrentes da lesão medular.....	91
5.1.1	<i>Efeitos deletérios da lesão medular no osso intacto (tíbia) e no processo de consolidação (fêmur)</i>	91
5.2	Terapia medicamentosa no tecido ósseo e na consolidação pós-fratura: alendronato de sódio e paratormônio	93
5.3	O ultrassom de baixa intensidade no tecido ósseo e na consolidação pós-fratura	96
6	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXO	110
	MANUSCRITO	112

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular, além do conhecido quadro paralítico, é acompanhada de repercussões importantes em vários órgãos e sistemas, tais como o desenvolvimento de bexiga neurogênica, disfunção intestinal neurogênica (1-3), comprometimento do aparelho respiratório (4), cardiovascular (5, 6), tegumentar (7, 8) e vascular (9). Incluem-se, ainda, desequilíbrios emocionais e disfunções endócrinas e sexuais.

O aparelho locomotor é particularmente afetado na lesão medular com quadros variáveis de paresia, paralisia e perda de sensibilidade (10-12), que causam desde pequenas limitações funcionais até invalidez completa e permanente, o que predispõe a deformidades, úlceras de pressão, rigidez articular e alterações na qualidade e estrutura óssea, que se manifestam por micro e macrodeterioração, perda de massa, fragilidade (13-18) e fraturas (14, 19-21).

Dentre as afecções que afetam o sistema esquelético desses indivíduos, a osteoporose secundária à lesão medular é uma condição com graves consequências em virtude da redução da massa e aumento da fragilidade óssea, o que predispõem a fraturas que, muitas vezes, passam despercebidas, o que pode levar ao diagnóstico tardio das suas ocorrências (22). Mesmo com dificuldades de diagnóstico, a incidência de fratura ao longo da vida do indivíduo com lesão medular chega a 70% (23, 24), com predomínio nos membros inferiores, facilitadas por deformidades, fisioterapia inadequada, acidentes de transferências, transporte ou prática de esportes.

Existem muitas razões para a intensa osteoporose que se associa à lesão medular. Uma causa importante é a perda de movimento e de função que leva à atrofia óssea por desuso e pela falta de inervação. Além desta, outras vias fisiopatológicas podem estar relacionadas como disfunções do sistema neuroendócrino (25). Os mecanismos motores, sensoriais e neuroendócrino podem estar envolvidos no reparo ósseo, mecanismo essencial para a consolidação de fraturas.

1.1 *Tecido ósseo*

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e proteção para os órgãos vitais. A matriz óssea é composta por células e material extracelular calcificado. Os osteócitos são células maduras localizadas em espaços ou lacunas localizadas no interior da matriz. Os osteoblastos, células imaturas, são produtores da matriz orgânica, e os osteoclastos são células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o

tecido ósseo. Juntos, esses tipos celulares realizam o processo de remodelação óssea que ocorre ao longo da vida e mantém a saúde do osso (26). A reparação óssea consiste na formação de osso novo, associado à reabsorção de osso antigo e ocorre permanentemente em todo o esqueleto. Entretanto, a ocorrência de uma fratura faz com que haja uma proliferação óssea localizada - calo ósseo - cujo objetivo é reparar o dano com restabelecimento da continuidade física entre os fragmentos fraturados e, assim, recuperar a integridade mecânica da região.

A arquitetura macroscópica da estrutura óssea é composta de ossos do tipo trabecular, ou esponjoso e cortical, ou lamelar (27). No primeiro tipo, as trabéculas estão dispersas em várias direções e se interconectam formando câmaras que são preenchidas por medula óssea (28). Entretanto, as trabéculas não estão distribuídas a esmo, com orientações diferentes que seguem a descarga das forças mecânicas locais. Este tipo de osso predomina nas extremidades do osso longo (epífises e metáfises), e em alguns ossos curtos ou irregulares como aqueles das mãos, pés e coluna vertebral. O osso cortical apresenta estrutura compactada e atua na manutenção da integridade estrutural, com predomínio na região central do osso longo (diáfise). É formado por lamelas sobrepostas, relativamente paralelas, com mínimo espaço entre elas. Nestes casos, a medula óssea fica concentrada no canal medular. Microscopicamente, cada trabécula apresenta uma estrutura peculiar formada pela sobreposição de vários anéis concêntricos, que contêm os osteócitos, em torno de um canal vascular e nervoso (este sistema é chamado haversiano) (29).

1.2 Osteopenia e osteoporose decorrentes da lesão medular

A osteoporose é definida como doença esquelética sistêmica que tem como consequência a grande redução de massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, o que aumenta a fragilidade óssea e, conseqüentemente, a susceptibilidade a fraturas (30). Dentre os muitos mecanismos que podem causar a osteoporose pode se citar o desuso por imobilização ou quadros paralíticos.

A osteoporose secundária à lesão medular afeta cerca de 61% dos indivíduos acometidos (31), e tem como principais causas a desnervação, mudanças hormonais e fatores mecânicos. Estas últimas são representadas pela falta de movimentos ativos, paralisia e falta de descarga de peso nos membros, além das deformidades e rigidez articular que interferem em todas as causas anteriores. Há no osso um complexo sistema de mecanotransdução, mecanismo pelo qual o estímulo mecânico é transformado em respostas biológicas, que podem atuar

formando ou absorvendo o tecido ósseo. Na falta de estímulos adequados surge deterioração da microarquitetura e redução da massa óssea (32).

Seja qual for a etiologia, o mecanismo celular da osteoporose fundamenta-se no desequilíbrio entre a formação (osteoblastos) e a reabsorção óssea (osteoclastos). A desnervação altera esse processo por meio da desregulação autonômica, estase venosa e redução de neuropeptídios (32). As mudanças hormonais afetam negativamente o balanço de cálcio como a deficiência de vitamina D, além do aumento dos hormônios como glicocorticóides e leptina. Além disso, há redução dos fatores de crescimento, hormônios sexuais e tireoidianos. Inicialmente, era entendido que a osteoporose após lesão medular fosse apenas nas estruturas localizadas abaixo da lesão, no entanto, após análises densitométricas realizadas em pacientes foi constatado que a perda óssea era difusa (33), apesar da maior gravidade ser distalmente à lesão.

Durante o primeiro ano de lesão medular a perda de massa óssea ocorre progressivamente do esqueleto proximal para distal, com altas taxas de acometimento em torno de 27% em fêmures nos primeiros quatro meses, sendo que 22% da perda ocorre nos três primeiros meses e, chega a 2% de perda óssea por semana na fase aguda (32). Em virtude da rápida e relevante perda de massa óssea e a fragilidade, os indivíduos com lesão medular apresentam alterações graves do metabolismo do cálcio que levam, por exemplo, a cálculos renais recorrentes, além da grande predisposição à fratura patológica.

1.3 *Reparo ósseo normal*

A remodelação óssea é um processo contínuo (34), e pode ser explicado pelo equilíbrio entre a deposição e reabsorção do osso, ocorrendo no osso cortical, mas com maior intensidade no osso esponjoso (35). A formação óssea ocorre em ciclos orquestrados pelas células osteoprogenitoras, em resposta a estímulos mecânicos e bioquímicos. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode acarretar ganho ou perda de massa óssea. Na fase de crescimento a formação óssea predomina, depois há um equilíbrio para, finalmente ocorrer um desequilíbrio em favor da maior reabsorção, geralmente iniciada em torno dos 40 anos de idade.

A fratura de um osso longo apresenta duas principais consequências: perda da continuidade do osso e incapacidade funcional (36), que deverão ser recuperadas com o reparo da fratura. O processo de reparo é considerado complexo e multifásico, envolvendo a atividade coordenada por hormônios e fatores de crescimento que levam ao recrutamento de células

multipotentes e suas ulteriores diferenciações celulares (37).

O processo de reparo da fratura inicia-se com o hematoma formado em resposta à lesão dos tecidos. Os fragmentos ósseos, periósteo e músculos adjacentes são ativados e delimitam um meio interno denominado foco da fratura. Células osteoprogenitoras são recrutadas e chegam ao local da lesão, proliferam-se e diferenciam-se em condrócitos, osteócitos e fibrócitos. Os condrócitos formarão cartilagem, que constituirá o calo ósseo mole que, em seguida, calcifica a matriz óssea, tornando-se mais resistente e protegendo o local fraturado. Segue-se a apoptose dos condrócitos pela invasão vascular das regiões com depósito de cálcio e, simultaneamente, os condroclastos absorvem tecido cartilaginoso mineralizado que é, depois, substituído por osso jovem ou entrelaçado (*woven bone*). A partir do periósteo surgem fibroblastos que vão se ossificar por mecanismo intramembranoso. Por último, e em longo prazo, o tecido ósseo sofre remodelação cujo objetivo é recuperar a anatomia e as funções originais do osso fraturado (28, 37).

A cascata de eventos desencadeada após a fratura contribui para a união das extremidades da fratura, que ocorre pela combinação da ossificação endocondral e intramembranosa (37), garantindo a formação do calo ósseo, que se torna um envelope mecânico protetor, o que confere a recuperação de grande parte das funções ósseas mecânicas (36).

1.4 Consequências da consolidação da fratura em ossos osteopênicos

A fratura é uma das principais complicações da osteoporose, resultando, entre outros malefícios, em maior incapacidade e dependência física (38).

A lesão medular é um quadro típico em que as pessoas acometidas apresentam perda de movimentos voluntários abaixo da lesão, dando origem à osteoporose que, de um quadro silencioso, pode abruptamente resultar em fratura. No entanto, devido às alterações de sensibilidade e as deformidades instaladas nos indivíduos acometidos, as fraturas são pouco diagnosticadas (22), e com poucas evidências radiográficas por se apresentarem apenas como pequenas fissuras, cuja visualização é dificultada pelo pouco osso que existe como pano de fundo.

A incidência de fraturas em indivíduos com lesão medular varia de 1,2 a 3,4 por 100 pacientes ao ano (20, 21, 31, 39, 40), enquanto que pacientes com alta gravidade a incidência é de 25% com taxas em torno de 2,9 em cada 100 pacientes, acometendo principalmente os ossos longos e, entre estes, o mais acometido é o fêmur (41). A epidemiologia dessa comorbidade na

população é crescente. Autores mostraram que a incidência de fraturas após 9 anos de lesão chega a 15,9%, aumentando drasticamente para 34% e 46% após 20 e 30 anos, respectivamente (21).

No quadro clínico da lesão medular, em virtude das alterações metabólicas, fisiológicas e estruturais, o processo de reparação óssea geral e em particular da fratura está alterado, devido principalmente pela má qualidade óssea.

Cerca de 70% dessas fraturas requerem hospitalização, e levam ao atraso da consolidação óssea ou mesmo não consolidação e, em casos extremos, à amputação (19, 42, 43), principalmente se acompanhadas de úlceras de pressão infeccionadas. A este quadro podem se agregar outros fatores de risco para o tratamento da fratura, como a necessidade de imobilização gessada ou mesmo cirurgias.

Além da alta incidência de fraturas nesses pacientes, os distúrbios de consolidação, por vezes, ocorrem com a formação de calos volumosos (44), que entretanto, têm má qualidade, e pouca resistência mecânica. Estatísticas de Nottage (1981) e Frotzler *et al.* (2015) apontam que nos indivíduos com lesão medular, um número muito maior das fraturas apresentam atraso na consolidação ou não consolidação (19, 20). A isso agregam-se outros fatores de morbidade como consolidações viciosas e escape de implantes ortopédicos devido à má qualidade óssea (19). Úlceras cutâneas causadas pela imobilização, falta de tratamento fisioterápico, fraturas, imobilizações gessadas, deformidades por consolidação viciosa das fraturas, deformidades progressivas de um calo plástico, falha da fixação do implante são todos fatores associados que, muitas vezes, complicam-se com septicemias, infecção renal e levam à morte. Esta sequência torna-se mais dramática naqueles indivíduos com nível alto de lesão (região cervical). Além disso, se for levado em consideração que a maioria das lesões medulares ocorre em pacientes jovens, associadas a esportes radicais e acidentes de trânsito (45), esses indivíduos viverão por muitos anos, com grande comprometimento da qualidade de vida e convivendo com comorbidades e complicações secundárias.

1.5 *Prevenção ou restauração da qualidade do tecido e calo ósseo*

Em virtude da alta incidência de osteoporose associada a fraturas patológicas e a vulnerabilidade do lesado medular, que também se tornam mais longevos, esforços devem ser direcionados no sentido de se buscarem métodos que melhorem o trofismo ósseo, a resistência óssea e diminuam as repercussões de fraturas. No arsenal de medidas protetoras, é utilizado recursos fisioterápicos, atividade física, manipulação ativa, colocação do paciente na posição

ortostática, prevenção de complicações pulmonares, prevenção da infecção do trato urinário, estilo de vida, alimentação, agentes farmacológicos, agentes físicos, etc. Paralelamente a esses esforços, buscaram-se maneiras de estimular a consolidação de uma fratura em um osso de má qualidade e com o trofismo já bastante comprometido. Entre as várias alternativas, esta pesquisa relaciona-se com uso de recursos farmacológicos como o bisfosfonato e paratormônio, e físico como a aplicação de ultrassom de baixa intensidade. Criamos condições experimentais de extrema osteoporose como aquela secundária à lesão medular para o ensaio desses métodos terapêuticos.

1.5.1 Bisfosfonatos

Um dos agentes farmacológicos mais conhecidos e utilizados no tratamento de doenças relacionadas com a perda de massa e com a fragilidade óssea são os bisfosfonatos. O alendronato de sódio é um bisfosfonato de terceira geração (46) usado clinicamente desde 1968 (47). Seu mecanismo de ação caracteriza-se pela ligação à hidroxiapatita, com ulterior liberação ao redor dos osteoclastos, de modo a interferir negativamente na capacidade de reabsorção óssea dessas células, na fase anabólica de remodelação (47, 48).

Visto que a inibição da atividade osteoclástica pelo uso dos bisfosfonatos altera a remodelação óssea, e esse evento é um componente importante na reparação de fraturas, ainda há discussão em relação à eficácia dessas substâncias na promoção da qualidade do calo ósseo (47, 49). Enquanto alguns autores observaram resultados positivos (50-53), outros relatam efeitos negativos como atraso na osteogênese reparatória (54-57). Há evidências que mostram que o depósito de bisfosfonatos no sítio de fratura está relacionado com o aumento no volume trabecular, melhora no conteúdo mineral ósseo e na resistência mecânica do calo ósseo (58-60). O uso desse medicamento em pacientes com lesão medular tem eficácia comprovada com relação à redução da perda de massa óssea e prevenção de fraturas (61). No entanto, seu papel no processo de consolidação não está completamente elucidado.

1.5.2 Paratormônio

O paratormônio (PTH) tem como principal função regular os níveis de fosfato e cálcio no sangue por meio da reabsorção óssea, absorção intestinal e renal desses íons (62). Diferentemente dos bisfosfonatos, o PTH ativa o recrutamento e diferenciação dos osteoclastos. No entanto, osteoclastos maduros não apresentam receptores para o PTH, diferente dos osteoblastos que apresentam enorme quantidade de receptores, por isso sua ação é mais

conhecida sobre o mecanismo de deposição óssea. Assim, teoricamente, esse medicamento pode atuar melhor na consolidação óssea, com preservação do *turnover* ósseo. Estudo mostra que o uso desse medicamento aumenta a conectividade trabecular, a espessura da córtex óssea, além de melhorar as propriedades mecânicas e microestruturais do osso íntegro (63).

A teriparatida, um fragmento recombinante sintético de 34 aminoácidos do PTH humano (64) parece exercer efeito positivo sobre o tratamento da osteoporose (65), já consolidado na literatura. No entanto, o mesmo efeito na consolidação de fraturas não foi conclusivo, com resultados controversos e divergentes quanto aos efeitos dose-dependente, tempo de administração e período de utilização (63).

Apesar do uso firmado desses agentes farmacológicos, os efeitos colaterais presentes em sua administração acautelam e geram dúvidas sobre o uso prolongado e fortalecem a necessidade de medidas não medicamentosas. Recursos mecânicos como terapia por vibração, eletroestimulação e ortostatismo foram utilizados em estudo experimental e apresentam resultados promissores em minimizar a perda de massa óssea decorrente da lesão medular (17, 66).

1.5.3 Ultrassom de baixa intensidade

O uso de recursos mecânicos para a reabilitação óssea é investigado devido muitos tecidos, entre os quais o osso, apresentarem a propriedade de mecanotransdução, que consiste em respostas fisiológicas a estímulos mecânicos o que contribui para o trofismo dos tecidos (67).

Fukada e Yasuda (1957) mostraram que o tecido ósseo tem a propriedade piezoelétrica, isto é, quando ele ou uma amostra dele sofrem flexão surgem cargas elétricas positivas no lado convexo (tração) e cargas negativas no lado côncavo (compressão) (68). Mais tarde, foi mostrado que cargas elétricas negativas estimulam a neoformação óssea e, reciprocamente, cargas positivas levam à reabsorção óssea. Estes achados levaram à tentativa de implantação de eletrodos em casos de atraso de consolidação de fraturas, na tentativa de promover a ossificação (69). Entretanto, este método é semi-invasivo, pouco eficiente e foi abandonado. A etapa seguinte foi o uso de campo eletromagnético para promover a consolidação (70). Este método é não invasivo, de longa duração, e apresenta pouca eficiência, de modo que atualmente é usado apenas em situações bem específicas.

A terceira geração da aplicação de estímulos físicos na tentativa de melhorar a consolidação de fraturas é representada pelo ultrassom de baixa intensidade (US). É uma forma

de energia mecânica que se propaga como onda de pressão produzindo tensões e deformações nos tecidos e áreas adjacentes (71), desencadeando vários tipos de respostas biológicas. Desenvolvido pelo pesquisador brasileiro LC Duarte, da Escola de Engenharia de São Carlos da USP, em parceria com nosso Laboratório (72, 73), foi concebido especialmente com parâmetros para aplicação em fraturas e tem o objetivo de estimular a formação do calo ósseo. Estudos duplo cegos mostraram a eficácia dessa terapia (74, 75) e o método foi registrado no *Food and Drug Administration* americano. Vários resultados experimentais (71, 76-83) e clínicos (75, 84-86) mostraram melhora no processo de consolidação de fraturas de ossos normais com esse recurso.

No entanto, o benefício da aplicação do US de baixa intensidade em fraturas de ossos acometidos por grave osteoporose, secundária a lesão medular, ainda não está estabelecido na literatura. Entretanto, alguns estudos evidenciaram que estímulos mecânicos aplicados em ossos osteoporóticos devido à supressão estrogênica produziram efeito positivo e preventivo na perda de massa e microdeterioração ósseas (74, 75, 80, 87).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Avaliar experimentalmente em fraturas do fêmur provocadas em ratos lesados medulares:

- 1 - O processo de consolidação óssea.
- 2 - A atuação do alendronato de sódio, paratormônio e ultrassom de baixa intensidade no reparo da fratura.

Secundariamente, avaliar o osso intacto:

- 3- Os efeitos da lesão medular na qualidade óssea.
- 4- E os efeitos da administração dessas terapias no osso não fraturado.

Material e Métodos

3 MATERIAL

3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais envolvidos nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 199/2015)².

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), variedade Wistar, com idade inicial de seis semanas, e massa corporal inicial entre 180g e 200g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os ratos ficaram durante cinco dias sem intervenção, em adaptação às condições do laboratório. Durante o experimento permaneceram em gaiolas individuais, sem restrição de acesso à água e à ração padrão (Nuvilab- ração de manutenção). A temperatura ambiente foi estabelecida entre 22°C e 24°C, controle de ambiente claro/escuro (12 x 12 horas) e controle da umidade relativa do ar em 55%±10. Diariamente, as condições de estresse do animal foram avaliadas pela presença ou não de pigmentos de porfirina ao redor dos olhos e focinho, além de observação do estado geral e comportamento (autolimpeza, atividade espontânea, reatividade e sono).

Os cuidados diários foram estabelecidos de acordo com o guia para cuidados e uso de animais de laboratório (*Animal models as tools in ethical biomedical research*, edição 2010) (88).

---

² Documento em anexo

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram casualmente distribuídos em cinco grupos, com 15 ratos por grupo (Quadro 1).

Quadro 1. Agrupamento dos ratos conforme o tratamento recebido

Grupos Experimentais	Detalhamento
CON Sem lesão medular e com fratura n=18	CON- rato controle com fratura, seguimento total de 24 dias.
LM Lesado medular com fratura n=15	LM - rato submetido à lesão medular e 10 dias depois a fratura do fêmur. Seguimento total de 24 dias.
LM+ALE Lesado medular com fratura e administração de alendronato de sódio n=15	LM+ALE - rato submetido à lesão medular e 10 dias depois a fratura do fêmur. Recebeu alendronato de sódio por 14 dias após fratura e seguimento total de 24 dias.
LM+PTH Lesado medular com fratura e administração de PTH n=4	LM+PTH - rato com lesão medular e 10 dias depois a fratura do fêmur. Recebeu PTH por 14 dias após fratura e seguimento total de 24 dias.
LM+US Lesado medular com fratura e aplicação de ultrassom de baixa intensidade n=15	LM+US- rato com lesão medular e 10 dias depois a fratura do fêmur. Recebeu aplicação de ultrassom por 14 dias após fratura e seguimento total de 24 dias.

Os animais do grupo CON foram submetidos ao procedimento simulado de lesão medular e 10 dias depois sofreram fratura do fêmur. Após a fratura foram acompanhados por 14 dias.

Os animais do grupo LM foram submetidos à lesão medular e 10 dias depois sofreram fratura do fêmur. Após a fratura foram acompanhados por 14 dias.

Os animais do grupo LM+ALE foram submetidos à lesão medular e 10 dias depois sofreram fratura do fêmur. Após a fratura foram acompanhados por 14 dias e receberam alendronato de sódio, por via subcutânea.

Os animais do grupo LM+PTH foram submetidos à lesão medular e 10 dias depois sofreram fratura do fêmur. Após a fratura foram acompanhados por 14 dias e receberam PTH, por via subcutânea.

Os animais do grupo LM+US foram submetidos à lesão medular e 10 dias depois sofreram fratura do fêmur. Após a fratura foram acompanhados por 14 dias e receberam sessões diárias de ultrassom aplicado no local da fratura.

Em todos os grupos a eutanásia ocorreu 24 dias após a produção da lesão medular (14 dias após a produção da fratura).

3.3 Procedimento experimental – indução cirúrgica da osteoporose por lesão medular

Os animais foram anestesiados por meio da combinação 1:1 de xilazina (7,5 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg), aplicada por via intramuscular na região glútea (0,1 mg/100 g). O procedimento foi realizado de acordo com as técnicas cirúrgicas rotineiras de assepsia e antissepsia. A região dorsal do animal foi tricotomizada, feita antissepsia com solução alcoólica 1% de polivinil-pirrolidona-iodo (PVPI) e isolada com campo cirúrgico fenestrado esterilizado. Com a palpação das costelas flutuantes foi identificado o processo espinhoso da 12ª vértebra torácica (T12) e dos outros processos espinhosos até a oitava vértebra. A musculatura paravertebral dessa região foi infiltrada com solução de adrenalina (diluição 1:1000), com objetivo de hemostasia. A incisão cirúrgica foi retilínea, sobre os processos espinhosos de T8 a T12, seguida da desinserção e afastamento da musculatura paravertebral. Foi realizada laminectomia da vértebra T10 para exposição da dura-máter. Por meio de pinça delicada curva, o saco dural foi levantado do canal vertebral e realizada secção completa das meninges e da medula espinhal. A incisão cirúrgica foi lavada com soro fisiológico e a musculatura paravertebral e pele foram aproximadas e suturadas separadamente (17). Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos até a exposição da dura-máter e elevação do saco dural, mas sem secção da medula. Após o procedimento cirúrgico foi administrada amoxicilina e ácido clavulânico (Synulox- Zoetis, Brasil) por via intraperitoneal, na dose de 2,0 mg/100 g de massa corpórea, solução de Ringer lactato (20 ml por via subcutânea, usado para reposição hidroeletrólítica e evitar choque hipovolêmico) e analgésico (0,03 mg/kg, por via intramuscular).

Diariamente foi realizada avaliação geral da saúde do animal para identificar possíveis complicações secundárias à lesão medular (úlceras de pressão, bexigoma, etc.) e tratá-las precocemente. O esvaziamento vesical foi realizado duas vezes por dia por pressão digital cuidadosa aplicada no baixo ventre.

3.4 Procedimento experimental – fratura óssea

Após 10 dias da lesão medular a região diafisária do fêmur direito foi fraturada, e realizada a fixação dos fragmentos ósseos com um fio de aço flexível colocado intramedularmente (fio de Kirschner).

Para isso, os animais foram anestesiados com a combinação (1:1; 0,1 mg/100 g) de xilazina (7,5 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg), aplicada por via intramuscular na região glútea esquerda. Em seguida, foi administrada a associação dos antibióticos amoxicilina e ácido clavulânico (Synulox- Zoetis, Brasil) por via intraperitoneal, na dose de 2,0 mg/100 g de massa corporal. Todo o membro pélvico direito foi tricotomizado e recebeu a aplicação de solução alcoólica 1% de polivinil-pirrolidona-iodo.

A fratura foi realizada pelo método da guilhotina de lâmina romba, especialmente confeccionada para este propósito (Figura 1). O animal foi posicionado em decúbito dorsal no aparelho com a coxa apoiada sobre dois suportes metálicos de vão livre de 10,0 mm. Na posição de abdução e rotação externa do membro posterior direito, a face interna da coxa foi exposta e posicionada de modo que sua posição central ficasse posicionada sob a lâmina romba da guilhotina que, por acionamento manual foi baixada, até a perda da resistência (geralmente acompanhada de um estalido).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 1. Alavanca desenvolvida para produção da fratura da diáfise femoral. O equipamento possui uma alavanca acionadora, baixa uma lâmina romba. A coxa do animal foi firmemente fixada entre os suportes metálicos e o braço da alavanca foi abaixado até a ocorrência da fratura

Em seguida, o animal foi levado para um ambiente cirúrgico, colocado em decúbito lateral esquerdo, sendo feita antisepsia de todo o membro pélvico direito com solução alcoólica 1% de polivinil-pirrolidona-iodo.

Após isolamento por campos esterilizados, foi feito um pequeno acesso cirúrgico na face lateral na coxa, sobre a região da fratura, identificada pela palpação. Em seguida, foi feito o aprofundamento pelo septo intermuscular até o foco da fratura, que foi minimamente exposto. A ocorrência e adequação da fratura foi confirmada sob visão direta, com o cuidado de não descolar as partes moles ainda aderidas aos fragmentos ósseos. Depois, um fio de Kirschner de 1,0 mm de espessura foi introduzido pelo canal medular do fragmento proximal, até sair pela pele na face lateral da raiz da coxa, onde foi feita uma incisão de mais ou menos 0,5 cm. A fratura foi reduzida por observação direta e o fio de Kirschner foi avançado em sentido contrário

pelo canal medular do fragmento distal, até que sua extremidade fosse sentida pela palpação da pele entre os côndilos do joelho. Após isso, o fio foi recuado até que a extremidade desaparecesse e, assim, evitar que o fio de Kirschner ficasse dentro da articulação. A adequação da redução da fratura, bem como sua estabilidade foi conferida diretamente, e o excesso do fio de Kirschner que saiu pela região pélvica foi cortado abaixo da pele e sua extremidade sepultada sob a massa muscular trocantérica. As incisões na região pélvica e lateral da coxa foram suturadas por planos com pontos separados de náilon 000. Na região operada foi aplicada uma solução antimutilante (Adestro, SP, Brazil³) para impedir a autofagia e a heterofagia. Ainda com o animal anestesiado, foi feita uma radiografia da coxa (incidência perfil), com distância de 115 cm entre foco e o *cassete* (Kodak-View 24x30 cm), com parâmetros de 5 mA e 44 kV em aparelho portátil de radiografias (Siemens- Unimax 2B - Rio de Janeiro- Brasil), com o objetivo de comprovar as adequações da fratura e da fixação. Foi obtida uma imagem digitalizada.

Os animais recuperaram-se da anestesia em ambiente aquecido e receberam 0,03 mg/kg de buprenorfina (Le Vet Pharma, Holanda) por via intramuscular aplicada 15 minutos antes da produção da fratura. Uma vez recuperados, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, de acordo com as normas técnicas do biotério.

Foram excluídos os animais que apresentassem fraturas fragmentadas (mais de três fragmentos soltos), com localização inadequada, oblíquas longas ou fixadas inadequadamente. Da mesma forma, foram excluídos animais que no seguimento apresentaram infecção, perda da redução da fratura, úlceras cutâneas, alteração da saúde geral, ou complicações viscerais.

O acompanhamento radiográfico ocorreu semanalmente pela mesma técnica: imediatamente após o procedimento cirúrgico, sete dias após e antes da eutanásia (Figura 2).

Os animais foram acompanhados durante 14 dias após a fratura, totalizando 24 dias de seguimento experimental (somados os 10 dias após o procedimento de lesão medular). Este tempo é suficiente para estabelecer grande osteoporose (89).

---

³ Medicamento composto de água deionizada, propilenoglicol, benzoato de denatônio e metilparabeno

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 2. Acompanhamento radiográfico. Imagem radiográfica obtida imediatamente após a fratura; 7 dias após a fratura e 14 dias após a fratura. Com o acompanhamento semanal foi possível observar o posicionamento correto do fio e adequação da fratura

3.5 Administração do alendronato de sódio

O alendronato de sódio foi manipulado a partir da substância pura (alendronato de sódio tri-hidratado 1%) e acondicionado em frascos ampola de 10 mL na concentração de 10mg/mL, que é a máxima em que se mantém solúvel.

A dose utilizada foi de 0,7 mg/kg aplicada subcutâneamente no dorso, uma vez por semana, durante 14 dias, segundo protocolo utilizado no Laboratório de Bioengenharia (90). A massa corpórea dos animais foi avaliada diariamente para ajuste da dosagem.

3.6 Administração do PTH

O paratormônio (PTH humano 1-34–Sigma Aldrich Co.) foi administrado cinco vezes por semana por via subcutânea no dorso, na dose de 20,0 µg/kg a partir do primeiro dia pós-operatório, até a eutanásia (62), com ajuste da dose conforme a variação da massa corporal.

3.7 Aplicação do ultrassom de baixa intensidade

A aplicação do ultrassom de baixa intensidade foi realizada com base no protocolo estabelecido por Duarte (1983). Os parâmetros pré-determinados no aparelho foram: frequência de 1,5 MHz, largura de pulso de 200 µs, amplitude de onda (pico a pico) de 25 V e intensidade de 30,0 mW/cm² (71). A primeira sessão foi iniciada 36 horas após a produção da fratura (para prevenir infecção da incisão) e repetidas cinco aplicações por semana, com 20 minutos de duração cada uma. Para isso os animais não foram anestesiados, mas cuidadosamente contidos manualmente. Sobre a incisão cirúrgica foi aplicado gel condutor e o transdutor posicionado na face lateral da coxa era mobilizado em pequenos movimentos circulares para garantir que toda a região da fratura recebesse o estímulo.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 3. Ilustração da aplicação do ultrassom. O cabeçote do transdutor foi colocado sobre a região da fratura acoplado à pele com gel condutor interposto, e associado a pequenos movimentos circulares para assegurar que toda a fratura fosse rastreada

3.8 Análises da estrutura óssea

A eutanásia ocorreu com dose excessiva do barbitúrico Tiopental® aplicada por via intraperitoneal. Por meio de punção cardíaca foi coletado sangue e armazenado, em freezer -80°C, para análise bioquímica.

Os fêmures direitos (com fratura) e tíbias diretas (intactas) de cada animal foram dissecados e mantidos em soluções próprias para cada análise futura. Os espécimes foram submetidos às seguintes análises.

3.8.1 Medidas macroscópicas da tíbia

Após a retirada e dissecação da tíbia os ossos foram pesados e o comprimento longitudinal foi medido.

3.8.2 Microtomografia computadorizada (micro-CT)

Para análise da microarquitetura óssea foi utilizado um microtomógrafo de alta resolução (SkyScan 1272v2; Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) do Laboratório 3B's Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics da Universidade do Minho, Portugal.

Este método é caracterizado pela análise tridimensional da estrutura óssea, fornecendo a microgeometria e a densidade mineral óssea. Permite a análise independente do osso trabecular e do cortical (91), além da quantificação do calo ósseo.

Os espécimes foram escaneados com os parâmetros 100 kV e 100 mA, com filtro de cobre com espessura de 0,11 mm para otimizar o contraste. Foi adotada rotação de 0,45° com média de dois quadros e resolução isotrópica de 16,2 µm. As imagens de cada espécime foram reconstruídas por meio de *software* específico (NRecon version 1.7.1; Bruker-microCT).

Toda a extensão do calo ósseo foi escaneada, enquanto que na tíbia, duas regiões de interesse foram analisadas: uma na metáfise proximal que contém principalmente osso trabecular e, outra, na região diafisária que contém principalmente osso cortical. As imagens dos ossos trabecular, cortical e do calo ósseo foram isoladas manualmente com o software CTAn (Bruker-microCT, version 2.2.1). Foi possível determinar o melhor *threshold*, a fim de excluir tecido mole e incluir tecido mineralizado. O mesmo *threshold* foi usado para todas as amostras, mas diferentes *thresholds* foram utilizados na avaliação do osso trabecular (63-250), cortical (70-250) e calo ósseo (63-250).

Todas as medidas das microestruturas do osso e calo e as nomenclaturas utilizadas seguem as recomendações da *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR)(92).

3.8.2.1 *Análise da microarquitetura do osso trabecular*

A região metafisária proximal da tíbia foi selecionada manualmente em uma extensão de 3,0 mm imediatamente distal à cartilagem de crescimento. A microarquitetura trabecular foi caracterizada pelo volume ósseo (BV; mm³), fração de volume trabecular ósseo (BV/TV; %), superfície óssea (BS/BV; mm), número de trabéculas (Tb.N; n°/mm), espessura trabecular (Tb.Th; µm), espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp; µm), densidade mineral trabecular (TMD; g/cm³) e densidade das conexões intertrabeculares (Conn.D; n°/mm³). Quanto maior os valores de BV, BV/TV, Tb.N, Tb.Th, TMD e Conn.D, melhor a qualidade da estrutura do tecido ósseo. Por outro lado, quanto maior o valor de Tb.Sp, pior a qualidade óssea.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 4. Figura ilustrativa da seleção da região trabecular de interesse na região proximal da tíbia a ser analisada pelo micro-CT

3.8.2.2 *Análise da microarquitetura do osso cortical*

A diáfise foi examinada em região de 2,0 mm de extensão, começando 8,0 mm da cartilagem de crescimento proximal da tíbia, e foi caracterizada pelo volume cortical (Ct.V; mm^3 e Ct.BV/TV; %), espessura cortical (Ct.Th; μm), densidade mineral do osso cortical (TMD; g/cm^3) e porosidade cortical (Ct.Po; %).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 5. Figura ilustrativa da delimitação da região diafisária de interesse para análise pelo micro-CT

3.8.2.3 *Análise da microarquitetura do calo ósseo*

A análise tridimensional do calo ósseo foi obtida por meio da avaliação do volume total do calo ósseo que foi selecionado em sua totalidade como região de interesse. Sua microarquitetura foi caracterizada pelo volume (BV; mm^3), fração de volume trabecular (BV/TV; %), superfície óssea do calo (BS/BV; mm), número de trabéculas (St.N; n°/mm), espessura das trabéculas do calo (St.Th; μm), espaçamento entre as trabéculas do calo (St.Sp; μm), densidade mineral (TMD; g/cm^3) e densidade das conexões intertrabeculares do calo (Conn.D; $\text{n}^\circ/\text{mm}^3$) e porosidade (Po; %).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 6. Figura ilustrativa da região de interesse correspondente ao calo ósseo destacada em vermelho, a ser analisada pelo micro-CT

3.8.3 Densitometria óssea

A densitometria óssea foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela dupla emissão de raios-X (DXA), com o uso do densitômetro Lunar DPX-IQ (*Lunar; software version 4.7e, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom*), pelo método de absorciometria bifotônica de raios-X (DXA: *Dual-energy X-ray Absorptiometry*). Os ossos foram posicionados no equipamento imersos em álcool etílico 70% com coluna líquida de altura de 4,0 cm, e escaneados em todo o comprimento.

A análise foi realizada no calo ósseo e na metáfise proximal da tíbia. Para isso, foi utilizada como região de interesse um quadrado de $0,09\text{cm}^2$ na metáfise proximal da tíbia, posicionado junto à cartilagem de crescimento. Foram estabelecidas como região de interesse figuras geométricas de tamanhos e formas variáveis que pudessem conter todo o calo ósseo. Os valores de densidade mineral óssea (DMO; g/cm^2), conteúdo mineral ósseo (CMO; g) e área do calo ósseo foram analisados nas regiões de interesse.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 7. Ilustração do posicionamento dos ossos para realização do exame de densitometria. A fileira superior corresponde aos fêmures e a inferior às tíbias

3.8.4 Análise mecânica

Após densitometria e microtomografia computadorizada, o fêmur com fratura foi submetido ao ensaio mecânico de torção em baixa velocidade na máquina INSTRON® 55MT no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Primeiro, as extremidades proximais e distais do fêmur foram incluídas em blocos cúbicos de resina acrílica e alinhados com um paralelômetro para possibilitar o correto posicionamento na máquina de ensaio. O teste foi realizado com célula de carga de 2,0 Nm, e aplicação de carga no sentido anti-horário, na velocidade de 30°/min. O bloco proximal ficou fixo e a rotação foi aplicada no bloco correspondente à extremidade distal, até ocorrer a falência mecânica. Os parâmetros usados foram torque máximo (N.m), ângulo de ruptura (grau) e rigidez (N.mm/grau) (Figura 8B).

As tíbias foram submetidas ao ensaio mecânico de flexão em três pontos, com a força aplicada sobre o centro da diáfise utilizando a máquina EMIC de Ensaio Universal. Os ossos foram posicionados sobre dois apoios (vão livre de 17,0 mm). A carga mecânica aplicada na face lateral da tíbia por meio de acessório com ponta romba fixada no eixo móvel da máquina (Figura 8A). Foi utilizada a célula de carga de 200 N, com aplicação da força no sentido vertical em velocidade de 2 mm/min, até a falência mecânica. Os parâmetros estudados foram força máxima (N) e rigidez (N.mm) (software TESC, versão 13.4).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 8. Ilustração do ensaio mecânico. (A) Ilustrações do ensaio mecânico de três pontos realizado na diáfise da tíbia. O osso ficou apoiado em suportes metálicos e a parte móvel da máquina exerce força vertical. (B) Ensaio mecânico de torção no fêmur, com as duas extremidades incluídas em resina acrílica. A extremidade proximal do espécime ficou fixa (3) e a rotação foi aplicada na extremidade distal (1), com o calo ósseo interposto (2)

3.8.5 Microscopia óptica

O processamento histológico ocorreu no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP⁴. Imediatamente após a dissecação, os ossos foram fixados em paraformaldeído 4%, descalcificados com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*) 10%, desidratados em crescentes concentrações alcoólicas para que em seguida ocorresse fixação em parafina e subsequente secção histológica. Toda a região do calo do fêmur e as regiões metafisária proximal e diafisária tibial foram seccionadas e utilizadas para a confecção das lâminas. Os espécimes foram incluídos em blocos retangulares de parafina com a face metafisária anterior voltada para baixo. Foram realizados 48 cortes seriados no plano coronal com espessura de 5,0 µm. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson, para identificação das trabéculas. O *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) foi usado, para marcar osteoclastos, que se tornam avermelhados e o *picro-sirius red* para a identificação das fibras colágenas. As secções foram analisadas sob microscopia de campo brilhante (Axiovert, Carl Zeiss, Alemanha), e as imagens capturadas com uma câmara CCD (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Alemanha) nas ampliações 12,5; 50, 100 e 200x.

Foram coletados 48 cortes seriados, sendo dois por lâmina, em toda extensão do calo ósseo e 48 cortes seriados da região metafisária da tíbia. Das 24 lâminas obtidas seis foram coradas por HE (lâminas 1, 5, 9, 13, 17 e 21), cinco pelo tricrômico de Masson (lâminas 2, 6,

⁴ Colaboração da Profa. Dra. Raquel Bezerra da Silva

10, 14 e 22), quatro pelo TRAP (lâminas 4, 8, 12 e 18) quatro pelo *picro-sirius red* (lâminas 7, 11, 15 e 23) e três lâminas foram destinadas à imunoistoquímica (lâminas 16, 20 e 24).

3.8.5.1 *Quantificação histológica do osso trabecular*

Para a quantificação da área do osso trabecular foi empregada a coloração em tricrômico de Masson e utilizado o microscópio óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) acoplado à câmera digital (Zeiss®), *software* Axiovision 4.8 grid system, do Laboratório de Ciências Morfométricas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP⁵. Foi selecionada uma área de 3,5 x 2,5 mm, aumento de 50 vezes. A tíbia foi analisada em uma região imediatamente abaixo do disco epifisário. Por meio do programa Axiovision® foi selecionada a cor azul (osso) que demarcou em verde toda área referente ao osso trabecular (Figura 9, A e B). A área foi expressa pela porcentagem da área de osso em relação à área total (B.Ar/Tt.Ar: %)(93).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 9. Secções histológicas coradas com tricrômico de Masson. (A) Fotomicrografia da área de seleção do osso trabecular. (B) Fotomicrografia do corte histológico da metáfise proximal da tíbia para identificação do tecido ósseo trabecular selecionado em verde a partir da demarcação dos tons de azul, com exclusão da área que representa a cartilagem de crescimento da tíbia (asterisco). Aumento 50x

3.8.5.2 *Quantificação do colágeno*

Nos cortes corados com *picro-sirius red*, sob luz polarizada e birrefringência, foi realizada a quantificação da área de colágeno onde as fibras aparecem na cor vermelho-alaranjada e verde-amarelada. A área avaliada foi de 3,5 x 2,5 mm, aumento de 50 vezes. O calo ósseo foi fotografado em quatro quadrantes correspondendo à toda a área e a tíbia foi analisada em uma imagem obtida imediatamente abaixo do disco epifisário (Figura 10). A quantificação foi realizada pelo programa Axiovision® que identifica as diferentes tonalidades

⁵ Colaboração do Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

de vermelho e verde, sob a polarização. A somatória das diferentes fibras (μm^2) e a área expressa pela razão da área de colágeno pela área total (Col.Ar/Tt.Ar: %) (93).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 10. Cortes histológicos corados com *picro-sirius red* e iluminados com luz polarizada e birrefringência para estudo do colágeno tanto do calo ósseo (A e B) como do osso intacto (C e D). (A) área de seleção do calo ósseo. (B) calo com identificação das fibras colágenas, expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado. (C) área de seleção da metáfise proximal da tíbia, adjacente ao disco epifisário. (D) metáfise proximal da tíbia, identificando as fibras colágenas, expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado. Nas imagens (B e D) as fibras colágenas tipo I (coradas em vermelho e alaranjado) foram selecionadas e marcadas pelo software utilizando a cor verde e as fibras tipo III (coradas em verde e amarela) foram marcadas na cor vermelha, para diferenciação dos tipos de fibra I e III, e para que a quantificação das fibras fosse possível. Aumento de 50x

3.8.5.3 *Quantificação de osteoclastos*

A quantificação dos osteoclastos foi obtida na coloração TRAP. Uma área de 3,5 x 2,5 mm foi selecionada no aumento de 100 vezes. O calo foi fotografado em quatro quadrantes correspondendo à toda sua extensão e a tíbia foi analisada em duas imagens realizadas em áreas metafisárias adjacentes ao disco epifisário. Pelo Axiovision® foi selecionada a cor vermelha demarcando toda área referente aos osteoclastos (Figura 11) e a área foi expressa pela razão da área de osteoclastos e área total (B.Ar/Tt.Ar: %) (93).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 11. Secções histológicas coradas pelo TRAP em que os osteoclastos aparecem em vermelho. (A) Calo ósseo. (B) Mesma área que "A", com os osteoclastos marcados em verde. (C) Metáfise proximal da tíbia. (D) Mesma área que em "C" com osteoclastos em verde. A cartilagem epifisária (*) não apresenta marcações em verde, pois não apresenta osteoclastos, logo a área não sofre reabsorção. Aumento de 100x

3.8.6 Imunoistoquímica

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em séries decrescentes de álcool e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). A seguir, foram submetidas à recuperação dos epítomos antigênicos (menor porção de antígeno com potencial de gerar a resposta imune) utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), aquecido em forno micro-ondas, por meio de sete disparos de 12 segundos, com intervalos de dois minutos entre cada disparo. Após estabilização da temperatura, foram realizadas lavagens em PBS por cinco minutos (3x) e a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% por 40 minutos. Seguiram-se lavagens em PBS por cinco minutos (3x) e os sítios de ligação não-específicos foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 5% por 60 minutos. A seguir, os tecidos foram incubados com anticorpos primários para osteoprotegerina (sc8468, policlonal *anti-goat*, Santa Cruz, Dallas-TX, EUA), RANK (sc9072, policlonal *anti-rabbit*, Santa Cruz, Dallas-TX, EUA) e RANKL (sc7628, policlonal *anti-goat*, Santa Cruz, Dallas-TX, EUA) 4°C, durante a noite. Depois, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários biotinilados por 1 hora (anti-goat e anti-rabbit), lavadas em PBS, e incubadas com complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit, Vecstain; Vector Laboratories Inc.) por 30 minutos. A substância 3,3- Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como substrato enzimático por cinco minutos; as lâminas foram lavadas

em PBS, contracoradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos, lavadas com água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e montadas. Lâminas controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcacão nas quais foi omitido o anticorpo primário e incubadas com PBS.

As marcações positivas para osteoprotegerina (OPG), RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa β) e RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β) foram avaliadas quantitativamente no calo ósseo e na metáfise proximal da tíbia. No calo ósseo foram selecionados oito quadrantes, sendo dois proximais na extremidade de cada cortical da fratura, com área de 3,5 x 2,5 mm, aumento de 200 vezes, varrendo toda a extensão. A tíbia foi analisada junto da cartilagem de crescimento epifisária com seleção de seis quadrantes, varrendo a extensão de um lado a outro. Com o programa Axiovision® foi possível selecionar a cor acastanhada referente à marcação positiva dos anticorpos (Figura 12) e quantificar a área de expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG. A quantificação foi expressa pela porcentagem da área de expressão da proteína pela área total (B.Ar/Tt.Ar: %)(93).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 12. Secções histológicas coradas por imunomarcacão das proteínas selecionadas RANK, RANKL e OPG que aparecem na cor acastanhada, na neoformação óssea do calo (A) e no tecido trabecular da tíbia (C). (B) Mesmo corte que "A" com marcação em verde para identificação das proteínas selecionadas (RANK, RANKL e OPG). (D) Corte imunoistoquímico da metáfise proximal da tíbia, marcada em verde para identificação da imunomarcacão das proteínas selecionadas (RANK, RANKL e OPG). Aumento de 200x

3.8.7 Análise molecular

Os fêmures e as tíbias foram armazenados em recipiente próprio (*RNAse free*), imersos em nitrogênio líquido e mantidos em *freezer* -80 °C até a extração. O procedimento ocorreu no Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP⁶, seguindo os passos: 1) Extração e quantificação do RNA; 2) Síntese de DNA complementar (cDNA); 3) quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA); 4) cálculo da expressão relativa do gene.

3.8.7.1 *Extração e Quantificação do RNA*

As amostras do calo ósseo do fêmur e das tíbias foram coletadas e processadas separadamente, trituradas e homogeneizadas em trizol. Em seguida, foi realizada a extração do RNA utilizando o kit (Promega, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e a quantificação por espectrofotometria de absorção (260 a 280nm) (Eppendorf Biophometer, USA).

3.8.7.2 *Síntese do cDNA*

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8.7.3 *Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)*

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real para quantificação da expressão de mRNA foram realizadas com o kit TaqMan® no termociclador StepOnePlus™ Real- Time PCR System (*Applied Biosystems*, USA). Para a análise de expressão gênica no processo de reparo ósseo e formação, os genes estudados foram: *Colla1* (Colagenase 1a1- ID: Rn01463848_m1), *Osterix* (Fator de transcrição Sp7- ID: Rn02769744_s1) e *Runx2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica- ID: Rn01512300_m1). Estes genes foram normalizados com o gene endógeno GaPDH (ID: Rn01775763_g1).

---

⁶ Colaboração Profa. Dra. Raquel Bezerra da Silva

3.8.7.4 Cálculo da Expressão Relativa do Gene

A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, cujo resultado representa a expressão relativa de mRNA, sendo:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{gene referência}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{grupo}} - \Delta Ct_{\text{grupo controle}}$$

3.9 Análise sérica dos marcadores de formação e reabsorção óssea

A análise foi realizada pelo método Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), em duplicata, por centrifugação da amostra sanguínea obtida por punção cardíaca. O soro foi obtido com a Microcentrífuga (Hettich® Universal 320R- Vestfália, Alemanha), 3500 rpm, aceleração 4g por 10 minutos. Nesse soro foram dosadas as concentrações séricas dos marcadores ósseos de formação osteoprotegerina (OPG) e fator de crescimento insulina tipo 1 (IGF1).

3.10 Análise estatística dos resultados

Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa RStudio (RStudio, Inc, USA). As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão (DP). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA para comparação dos dados entre os grupos experimentais. O pós-teste de Tukey foi aplicado para a múltipla comparação entre os grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

Para a formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5® (GraphPad Software, Inc, São Paulo).

Quadro 2. Resumo das metodologias e as avaliações utilizadas

<i>Método de análise</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Função</i>
Macroscópica	Massa	Análise das medidas morfológicas do tecido ósseo
	Comprimento	
	Perímetro	
Densitometria óssea	DMO	Análise da densidade e o conteúdo mineral do tecido ósseo
	CMO	
Microtomografia computadorizada	μCT trabecular	Análise da microarquitetura trabecular, cortical e do calo ósseo
	μCTcortical	
	μCTcalo	
Ensaio mecânico	Torque	Análise das propriedades mecânicas do tecido ósseo
	Rigidez	
	Ângulo de ruptura	
	Força máxima	
Histologia	Hematoxilina-Eosina (HE) - Coloração para analisar o tecido conjuntivo, cartilaginoso e trabecular	Análise microscópica do tecido celular ósseo
	Tricrômico de Masson - Coloração para analisar o tecido ósseo trabecular	
	<i>Tétrade resistance acid phosphatase</i> (TRAP) - Coloração para analisar as células osteoclásticas	
	<i>Picro-sirius Red</i> - Coloração para analisar fibras colágeno	
Imunoistoquímica	RANKL (RANK ligante) - Molécula que atua na diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros	Análise da expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG no tecido ósseo
	RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B) - Receptor do RANKL, expresso na superfície dos osteoclastos	
	OPG (osteoprotegerina) - Proteína bloqueadora da osteoclastogênese	
Biologia Molecular	Osterix - Fator de transcrição específico de osteoblastos na fase de diferenciação de pré osteoblastos em osteoblastos maduros	Análise da expressão gênica dos genes de formação e reabsorção óssea
	Runx2 (fator 2 de transcrição) - Gene essencial para a diferenciação osteoblástica: ativa e/ou reprime outros genes envolvidos na formação do tecido ósseo	
	Col1a1 (colagenase 1a)- Gene responsável pela produção de colágeno tipo 1	
ELISA	IGF-1 - Fator de crescimento tipo insulina I	Análise bioquímica que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo
	OPG - Marcador bioquímico de bloqueio da osteoclastogênese	

Resultados

4 RESULTADOS

O quadro 3 caracteriza o total de animais utilizados e aqueles desprezados, juntamente com o motivo, em cada grupo.

Quadro 3. Total de animais incluídos e excluídos, com as causas, em cada grupo

Grupo	n total	n final	n excluído	% de n desenvolvido
LM	55	15	73% 15 → ruptura vesical durante manobra de esvaziamento 8 → autofagia 2 → morte durante indução anestésica (LM) 1 → ascite 3 → causa desconhecida 1 → distúrbios respiratórios 1 → distúrbios intestinais 1 → infecção renal 5 → cominuição excessiva dos fragmentos ou fratura mal localizada 1 → extrusão do fio de Kirschner 2 → morte durante indução anestésica (fratura)	100%
LM+ALE	40	15	62% 8 → ruptura vesical durante manobra de esvaziamento 5 → autofagia 4 → distúrbios intestinais 1 → infecção renal 4 → cominuição excessiva dos fragmentos ou fratura mal localizada 3 → morte durante indução anestésica (fratura)	100%
LM+PTH	9	4	55% 1 → ruptura vesical durante manobra de esvaziamento 1 → autofagia 1 → infecção renal 1 → cominuição excessiva dos fragmentos ou fratura mal localizada 1 → morte durante indução anestésica (fratura)	100%
LM+US	45	15	67% 10 → ruptura vesical durante manobra de esvaziamento 7 → autofagia 5 → distúrbios intestinais 3 → infecção renal 2 → cominuição excessiva dos fragmentos ou fratura mal localizada 3 → morte durante indução anestésica (fratura)	100%
COM	26	18	30% 8 → pós-operatório pela extrusão do fio de Kirschner	100%

4.1 Perda animal decorrente da lesão medular

Dos 149 animais submetidos à lesão medular, 78 (52%) foram perdidos por complicações decorrentes da lesão medular em si, enquanto que após fratura houve perda de 22 animais (15%).

4.1.1 Complicações decorrentes da lesão medular

As seguintes complicações podem ser atribuídas à lesão medular e levaram à perda de 78 animais por alterações respiratórias, ascite, infecção urinária, constipação intestinal, bexigoma, ruptura de bexiga, trombose, úlceras de pressão e autofagia ou automutilação (Figura 13).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 13. Ilustração das complicações decorrentes da lesão medular. A - Trombose; B - lesão cutânea por pressão; C - bexigoma sanguinolento; D - distensão de alça intestinal; E - autofagia na região do joelho; F - automutilação nas patas

4.2 Perda animal decorrente da produção da fratura

Dos 149 animais induzidos à lesão medular e que foram submetidos à fratura 22 (15%) não sobreviveram após este procedimento ou morreram no pós-operatório recente. Dos casos excluídos, um (4%) ocorreu pela migração do fio de Kirschner, 12 (54%) em virtude da cominuição excessiva dos fragmentos da fratura e nove (42%) ocorreram durante a indução anestésica. A perda de oito animais (30%) do grupo controle ocorreu em período pós-operatório tardio devido à migração do fio de Kirschner, totalizando a perda de 30 animais entre grupos.

4.3 Acompanhamento da massa corpórea

A Figura 14 mostra a evolução da massa corpórea no tempo zero (lesão medular ou cirurgia *sham*) 10 e 14 dias após fratura. Antes de qualquer intervenção, não houve diferença na massa corporal (dia 0, $p>0,05$). No entanto, ao final do seguimento, os animais lesados medulares ganharam menos massa que os animais controle ($p<0,05$); 38% e 98%, respectivamente da massa inicial. Os tratamentos aplicados aos animais paraplégicos não alteraram significativamente a ganho da massa corpórea ($p>0,05$).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 14. Evolução da massa corpórea em todos os grupos nos dias 0 (início do experimento e produção da lesão medular), 10 (realização fratura) e 24 (14 dias após fratura e na eutanásia). No início do experimento (dia 0) não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Nos dias 10 e 24 foi possível observar que os animais controle ganharam mais massa corpórea que os animais paraplégicos ($p<0,05$). Os tratamentos a que animais paraplégicos foram submetidos não alteraram o ganho de massa ($p>0,05$).

4.4 Acompanhamento radiográfico

A Figura 15 apresenta o acompanhamento das imagens radiográficas dos animais dos grupos experimentais, imediatamente após a fratura, sete dias após o procedimento cirúrgico e antes da eutanásia. Foi realizada radiografia semanalmente para acompanhamento do posicionamento e alinhamento da estabilização, realizada com o fio de Kirschner, da fratura.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 15. Acompanhamento radiográfico para confirmar a adequação da fratura e redução nos tempos: imediatamente (PO 0), primeira semana (PO 7) e segunda semana (PO 14) após a fratura. Ratos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE), ultrassom (LM+US) e paratormônio (LM+PTH)

4.5 Medidas macroscópica da tíbia: massa, comprimento e perímetro

Na tabela 1 estão as medidas de massa, comprimento e perímetros (metáfise proximal e distal) da tíbia.

Com base na tabela 1 é observado que a lesão medular induziu reduções significativas ($p<0,05$) nas medidas de massa óssea em -13%, comprimento em -6% e perimetria na metáfise proximal da tíbia em -9% comparado ao controle. Essas reduções persistiram no grupo tratado com alendronato (comprimento e perimetria metáfise proximal). Por outro lado, o alendronato induziu aumento significativo ($p<0,05$) na massa óssea da tíbia em +22% relação aos animais paraplégicos (LM).

Tabela 1- Medidas macroscópicas da tíbia direita, intacta sem fratura (CON, LM, LM+ALE, LM+US e LM+PTH)

	CON	LM	LM+ALE	LM+US	LM+PTH
Massa óssea (g)	0,77±0,06	0,67±0,09 ^a	0,82±0,11 ^b	0,71±0,13	0,61±0,07
Comprimento (mm)	38,93±0,46	36,73±1,76 ^a	36,48±1,29 ^a	37,44±0,75 ^a	37,38±0,06
P. met. prox. (mm)	20,31±1,04	18,48±1,29 ^a	17,99±1,41 ^a	19,43±1,61	19,13±1,95
P. met. distal (mm)	13,69±0,39	13,43±1,30	12,37±1,84	12,17±1,23 ^a	11,65±1,06

^a $p<0,05$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM

4.6 Análise densitométrica da tíbia e do calo ósseo

As figuras 16 e 17 mostram a comparação da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO), respectivamente, entre os diferentes grupos, nas metáfises proximais das tíbias direitas. Os animais paraplégicos sem tratamento apresentaram redução nos valores de DMO em -43% e CMO em -70% comparado aos controles ($p<0,05$). Os tratamentos com alendronato de sódio e paratormônio foram eficazes em normalizar a DMO e CMO apresentando aumento de +100% e +133% respectivamente no grupo tratado com alendronato. O paratormônio foi eficaz em aumentar em +100% a DMO e +135% a CMO, no entanto, isso não ocorreu com o grupo tratado com ultrassom.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 16. Densidade mineral óssea (DMO) nos grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE), ultrassom (LM+US) e paratormônio (LM+PTH) na tíbia direita. Houve redução da DMO nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que os tratamentos com alendronato e paratormônio foram eficazes na reversão da perda, mas não o ultrassom. ^ap<0,05 versus CON; ^bp<0,05 versus LM; ^cp<0,05 versus LM+ALE; ^dp<0,05 versus LM+PTH

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 17. Conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE), ultrassom (LM+US) e paratormônio (LM+PTH) na tíbia direita. Houve redução da CMO nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que os tratamentos com alendronato e paratormônio reverteram essa perda, mas não o ultrassom. ^ap<0,05 versus CON; ^bp<0,05 versus LM; ^cp<0,05 versus LM+ALE; ^dp<0,05 versus LM+PTH

A figura 18 mostra a comparação da DMO, CMO e área do calo ósseo entre os grupos na região diafisária do fêmur direito (no calo ósseo). Os animais paraplégicos sem tratamento apresentaram redução de -41% de DMO comparado aos controles (p<0,05). O tratamento com alendronato foi eficaz em aumentar a DMO em +50% e o tratamento com ultrassom em +20% nesses animais, comparados aos animais lesados medulares sem tratamento (p<0,05).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 18. Densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e área do calo ósseo nos vários grupos. Houve redução da DMO nos animais paraplégicos sem tratamento, enquanto que o tratamento com alendronato e ultrassom reverteram essa perda de densidade óssea. ^a $p < 0,05$ versus CON; ^b $p < 0,05$ versus LM. Apesar do conteúdo mineral ósseo ser menor nos animais paraplégicos e os tratamentos melhorarem essa condição não houve diferença significativa entre os grupos. A área do calo foi maior em todos os grupos lesados medulares, mas não houve significância estatística ($p > 0,05$)

4.7 Análise qualitativa e quantitativa da microarquitetura óssea (micro-CT)

4.7.1 Análise qualitativa e quantitativa da microarquitetura trabecular

A figura 19 ilustra deterioração importante da microestrutura trabecular nos animais paraplégicos sem tratamento, em relação aos outros grupos. Os tratamentos realizados foram eficazes em minimizar os efeitos negativos da lesão medular.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 19: Imagens tridimensionais da microarquitetura trabecular da metáfise tibial. Há redução expressiva do osso trabecular nos ratos paraplégicos sem tratamento (LM) em comparação com o controle. Essas alterações foram amenizadas pelos tratamentos com alendronato de sódio, ultrassom e paratormônio

A tabela 2 apresenta os resultados quantitativos da microarquitetura trabecular das tíbias intactas. A lesão medular induziu reduções significativas ($p < 0,05$) em BV (-78%); BV/TV (-73%); Tb.N (-68%); Conn.D (-68%, $p > 0,1$), além de aumentar Tb.Sp (+84%). Os tratamentos com alendronato, PTH e ultrassom foram eficazes em minimizar e até reverter as alterações microtomográficas causadas pela paraplegia. O alendronato induziu aumentos significativos em BV (+841%); BV/TV (+728%); Tb.Th (+30%); Tb.N (+576%); ConnD (+1277%); TMD (+37%), além de redução de Tb.Sp (-55%) e BS/BV

(-35%). O PTH induziu aumentos em BV (180%) e BV/TV (+249%) e redução de Tb.Sp (-57%, $p<0,05$). O ultrassom induziu aumento na Conn.D (+3%) e redução na BS/BV (-5%) apesar de não ter apresentado diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 2- Microarquitetura óssea trabecular. Os resultados confirmam os achados qualitativos da figura anterior. Houve deterioração do tecido trabecular dos animais paraplégicos quando comparados aos animais controle. A lesão medular induziu reduções significativas no BV, BV/TV, Tb.N e aumento na Tb.Sp. Os tratamentos com alendronato de sódio e paratormônio foram eficazes em minimizar essas reduções e até reverter as perdas, aproximando-se dos ratos normais

Metáfise tibial (osso trabecular)	CON	LM	LM+ALE	LM+PTH	LM+US
BV (mm³)	3,19 ± 1,90	0,70 ± 0,40 ^a	6,63±1,83 ^{a,b}	1,96±0,51 ^c	0,55±0,30 ^a
BV/TV (%)	6,68 ± 4,68	1,81 ± 1,02 ^a	14,95±4,15 ^{a,b}	6,30±0,17 ^c	1,44±0,80 ^a
Tb.Th (mm)	0,05 ± 0,004	0,04 ± 0,004	0,06±0,01 ^{a,b}	0,05±0,003	0,05±0,001
Tb.N (mm)	1,21 ± 0,88	0,39 ± 0,23 ^a	2,61±0,51 ^{a,b}	1,27±0,07 ^c	0,31±0,17 ^a
Tb.Sp (mm)	0,60 ± 0,34	1,10 ± 0,24 ^a	0,50±0,09 ^b	0,48±0,11 ^b	1,25±0,37 ^a
TMD (g/cm³)	0,30 ± 0,05	0,27 ± 0,01	0,37±0,02 ^{a,b}	0,33±0,01	0,28±0,01
Conn.D (1/mm)	74,60 ± 76,87	23,85 ± 9,16	328,43±69,19 ^{a,b}	64,94±6,05 ^c	24,48±15,80
BS/BV (mm)	86,97 ± 3,21	94,81 ± 11,70	61,73±10,00 ^{a,b}	78,54±6,40	90,05±5,43

^a $p<0,05$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM; ^c $p<0,05$ versus LM+ALE.

4.7.2 Análise qualitativa e quantitativa da microarquitetura do osso cortical

Assim como no osso trabecular, mas em menor escala, a lesão medular também causou deterioração da microarquitetura cortical (Figura 20). Os tratamentos foram eficazes em minimizar essa deterioração.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 20: Imagens ilustrativas tridimensionais da microarquitetura da córtex da diáfise tibial. Houve deterioração óssea nos ratos paraplégicos em relação ao controle, bem como efeito positivo das terapêuticas no tecido da córtex

A tabela 3 apresenta os resultados quantitativos da microarquitetura cortical das tíbias. A lesão medular induziu reduções significativas em Ct.V (-33%), Ct.BV/TV (-17%) e TMD (-9%). Todos os tratamentos foram eficazes em minimizar e até reverter as alterações microtomográficas causadas pela paraplegia. O alendronato induziu

aumentos significativos em Ct.V (+36%), Ct.BV/TV (+24%), Ct.Th (+28%) e na TMD (+13%). O ultrassom induziu aumento significativo em Ct.V (+21%) e em Ct.BV/TV (+15%). O PTH induziu aumentos significativos em Ct.V (+39%), Ct.BV/TV (+25%), Ct.Th (+32%) e na TMD (+16%, $p=0,09$).

Tabela 3- Análise quantitativa da microestrutura do osso cortical. Os resultados confirmam os achados qualitativos da figura anterior, em que é possível observar importante redução de tecido cortical nos animais paraplégicos. Os tratamentos foram eficazes em minimizar essas reduções e até reverter as perdas, aproximando-se de ratos normais

Diáfise tibial (osso cortical)	CON	LM	LM+ALE	LM+PTH	LM+US
Ct.V (mm ³)	7,51 ± 0,76	5,01 ± 0,53 ^a	6,81±0,58 ^b	6,97±0,79 ^b	6,39±0,37 ^{a,b}
Ct.BV/TV (%)	70,03 ± 3,32	58,39 ± 6,07 ^a	72,40±2,59 ^b	72,87±3,27 ^b	67,18±4,85 ^b
Ct.Th (mm)	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,28±0,02 ^b	0,29±0,04 ^b	0,25±0,03
Ct.Po (%)	39,33 ± 10,96	35,13 ± 3,71	29,79±3,98 ^{a*}	27,13±3,28	32,82±4,85
TMD (g/cm ³)	0,35 ± 0,03	0,32 ± 0,01 ^a	0,36±0,02 ^{b*}	0,37±0,02 ^{b*}	0,33±0,01

^a $p<0,05$ versus CON; ^{a*} $p=0,07$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM; ^{b*} $p=0,06$ versus LM; ^{b*} $p=0,09$ versus LM

4.7.3 Microarquitetura do calo ósseo

A Figura 21 mostra a imagem microtomográfica dos calos ósseos. Apesar da intensa deterioração óssea observada nos animais paraplégicos, as imagens mostram formação de calo ósseo com poucas alterações em relação aos animais controle. O volume do calo ósseo foi menor nos animais paraplégicos. Os tratamentos melhoraram a qualidade da microarquitetura do tecido ósseo neoformado.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 21: Imagens dos calos ósseos obtidas pela μ CT, tanto no plano sagital, como transversal. A ilustração mostra que a lesão medular induziu poucas alterações na neoformação óssea, mas os tratamentos propostos causaram melhora na qualidade do calo ósseo externo, que apresentaram maior volume e mineralização

A tabela 4 mostra os parâmetros da microarquitetura dos calos ósseos dos fêmures fraturados. A lesão medular induziu reduções significativas ($p < 0,05$) em St.Th (-13%) e aumento significativo em St.N (+17%) e porosidade (+5%). Os tratamentos induziram alterações positivas importantes nos calos ósseos de animais paraplégicos.

O alendronato induziu aumentos significativos na BV (+68%); BV/TV (+67%); St.N (+90%), Conn.D (+222%) e na TMD (+212%), além de redução de Tb.Sp (-51%) e Po (-25%).

O PTH induziu aumento significativo na St.Th (+38%), BV/TV e Conn.D (+18% e +3% respectivamente, $p > 0,05$), e redução na porosidade (-8%, $p > 0,05$).

O ultrassom induziu aumentos significativos em St.N (+35%), Conn.D (+159%) e na TMD (+137) e reduções em St.Sp (-45%) e porosidade (-9%, $p > 0,05$). Todos os tratamentos melhoraram a microarquitetura do calo ósseo, principalmente o alendronato.

Tabela 4- Análise quantitativa da microarquitetura do calo ósseo no controle e os vários tipos de tratamento

Parâmetros do μ CT	CON	LM	LM+ALE	LM+PTH	LM+US
BV (mm^3)	30,33 $\pm$ 7,55	25,37 $\pm$ 9,44	42,51 $\pm$ 14,10 ^b	26,53 $\pm$ 4,76	28,77 $\pm$ 12,74
BV/TV (%)	22,82 $\pm$ 2,73	24,06 $\pm$ 4,79	40,23 $\pm$ 8,46 ^{a,b}	28,34 $\pm$ 5,24 ^c	27,19 $\pm$ 6,99
St.Th (mm)	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01 ^a	0,07 $\pm$ 0,004	0,10 $\pm$ 0,02 ^{a,b,c}	0,07 $\pm$ 0,01 ^a
St.N (1/mm)	2,55 $\pm$ 0,41	2,98 $\pm$ 0,30 ^a	5,65 $\pm$ 0,92 ^{a,b}	3,01 $\pm$ 0,58 ^c	4,01 $\pm$ 0,85 ^{a,b}
St.Sp (mm)	0,25 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,06 ^{a',b}	0,25 $\pm$ 0,09 ^c	0,14 $\pm$ 0,03 ^{a,b}
TMD (g/cm^3)	0,06 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,09 ^{a,b}		0,19 $\pm$ 0,15 ^{a',b}
Conn.D (1/mm)	285,75 $\pm$ 38,68	274,90 $\pm$ 26,04	886,11 $\pm$ 101,82 ^{a,b}	284,27 $\pm$ 92,57 ^c	711,48 $\pm$ 113,37 ^{a,b}
Po (%)	76,07 $\pm$ 1,96	80,08 $\pm$ 2,43 ^a	59,77 $\pm$ 8,46 ^{a,b}	73,27 $\pm$ 4,21 ^c	72,81 $\pm$ 6,99 ^{a''}

^a $p < 0,05$ versus CON, ^{a'} $p = 0,07$ versus CON, ^{a''} $p = 0,09$ versus CON, ^b $p < 0,05$ versus LM, ^c $p < 0,05$ versus LM+ALE

4.8 Análise de histologia óssea

As figuras 22, 23 e 24 apresentam cortes das metáfises proximais das tíbias, enquanto que as figuras 26, 27 e 28 mostram os cortes do calo ósseo nos vários grupos.

4.8.1 Histologia descritiva da metáfise proximal da tíbia

A figura 22 apresenta os cortes histológicos corados com HE e fotografados com 50 vezes de aumento. Houve importante perda de tecido ósseo nas metáfises proximais dos animais paraplégicos. Qualitativamente os tratamentos (especialmente o alendronato de sódio) mostraram-se eficazes em minimizar a perda de tecido trabecular, além de melhorar a organização e a espessura das trabéculas.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 22: Cortes histológicos coronais da metáfise proximal de tíbias coradas em HE em animais representativos de cada grupo. O controle (CON) mostra a cartilagem de crescimento com seu arranjo colunar típico. A região adjacente está formada por trabéculas de osso jovem e a porção mais inferior da figura ilustra o predomínio de medula óssea nos espaços inter trabeculares. Na figura no lesado medular (LM) chama a atenção a grande falha óssea central, com desaparecimento de tecido ósseo. No tratamento com alendronato a porção metafisária está densamente preenchida por osso trabecular. O ultrassom (LM+US) causou aumento do trabeculado metafisário, mas que não se igualou ao controle, além do trabeculado ser mais fino e menos organizado. No tratamento com paratormônio (LM+PTH) há trabeculado de boa qualidade, principalmente na região mais próxima da placa de crescimento. Coloração em HE e aumento de 50x

A figura 23 apresenta cortes histológicos coronais da metáfise proximal da tíbia, corados com TRAP e fotografados com aumento de 50 vezes. Houve aumento da atividade osteoclástica nos animais paraplégicos e a consequente perda de tecido ósseo. Os tratamentos diminuíram o número de osteoclastos.

A figura 24 apresenta cortes histológicos da região metafisária da tíbia corados com *picro-sirius red*. Houve redução da deposição de colágeno nos animais paraplégicos provavelmente devido à importante perda de tecido ósseo. Os tratamentos induziram o aumento na deposição de colágeno.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 23: Cortes histológicos coronais da metáfise proximal de tíbias coradas com TRAP. Houve aumento importante na atividade osteoclástica nos animais paraplégicos, e redução naqueles tratados com paratormônio. Aumento de 50x

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 24: Cortes histológicos da metáfise proximal de tíbias coradas com *picro-sirius red*. Houve redução importante na deposição de colágeno nos animais paraplégicos. Os tratamentos, por outro lado, aumentaram a deposição de colágeno, principalmente no grupo alendronato. Aumento de 50x

4.8.1.1 *Quantificação histológica na tíbia*

A figura 25 apresenta os cortes histológicos corados com tricrômico de Masson, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) e *picro-sirius red* fotografados respectivamente nos aumentos de 50, 100 e 50 vezes. Na primeira coluna estão as secções em tricrômico de Masson. No osso trabecular da tíbia a paraplegia causou redução das trabéculas. No entanto, os tratamentos amenizaram ou reverteram esse quadro, principalmente nos grupos alendronato e PTH. A segunda coluna mostra aparente aumento de osteoclastos no grupo lesado medular. O ultrassom, paratormônio e alendronato reduziram o número de osteoclastos. A terceira coluna mostra a coloração em *picro-sirius red* representando a deposição de colágeno tipo I (fibras vermelhas e alaranjadas) e tipo III (fibras verdes e amarelas) na região metafisária da tíbia. A lesão medular reduziu a quantidade de colágeno tipo I e aumentou a deposição de colágeno tipo III. Houve redução em ambos os tipos de colágenos com os tratamentos com alendronato de sódio e ultrassom. No entanto o PTH aumentou a deposição das fibras do tipo I e III.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 25. Cortes histológicos da metáfise das tíbias dos animais dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento corados com tricrômico de Masson, *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) e *picro-sirius red* (PICRO) respectivamente nos aumentos de 50x, 100x e 50x. Foi observado que a lesão medular afetou significativamente a qualidade do tecido ósseo intacto, porém a terapêutica utilizada foi capaz de reverter essa condição. A lesão medular aumentou a presença de osteoclastos e os tratamentos foram capazes de reduzi-la. O colágeno foi reduzido nos grupos com lesão medular, mas o PTH aumentou o depósito de ambos os tipos de colágeno

A tabela 5 apresenta os resultados da histomorfometria que mostra redução significativa na massa óssea trabecular (-54%) no grupo lesado medular e aumento da atividade osteoclástica (+96%) em comparação com o controle sem lesão ($p<0,05$).

O alendronato de sódio causou aumento significativo na formação óssea trabecular (+305%) e diminuição da atividade osteoclástica (-34%) em comparação com o lesado medular ($p<0,05$).

O paratormônio inibiu significativamente a atividade osteoclástica (-60%), enquanto que houve aumento de depósito do colágeno tipo I de 208% ($p<0,05$) e colágeno total de 141% ($p>0,05$) em comparação com os lesados medulares.

O tratamento com ultrassom mostrou inibição da atividade osteoclástica (-32%, $p<0,05$), aumento da formação óssea (+57%) e redução na formação de colágeno tipo III (-77%) apesar da diferença não ser significativa ($p>0,05$), comparado ao grupo lesado medular sem tratamento.

Tabela 5- Histomorfometria da metáfise proximal da tíbia, área reabsortiva (TRAP), formação óssea (Masson), formação de colágeno tipo I (Coll_1), tipo III (Coll_3) e colágeno total (Coll_total) nos grupos controle (CON), lesado medular (LM) e lesados medulares tratados (LM+ALE, LM+PTH, LM+US)

	CON	LM	LM+ALE	LM+US	LM+PTH
Metáfise tibial (osso trabecular)					
TRAP (% area)	0,51 ± 0,09	1,00 ± 0,15 ^a	0,66±0,17 ^b	0,68±0,24 ^b	0,40±0,19 ^b
Masson (% area)	14,87 ± 2,51	6,85 ± 2,45 ^a	27,74±6,43 ^{a,b}	10,75±2,08	6,23±1,62 ^{a',c}
Coll_1 (% area)	4,29±1,99	2,57±1,79	3,19±1,71	2,98±2,42	7,92±2,18 ^{a',b,c}
Coll_3 (% area)	0,78±0,83	2,17±2,92	0,64±0,55	0,50±0,21	3,51±4,96
Coll_total (% area)	5,07±2,13	4,74±4,34	3,82±2,02	3,48±2,51	11,43±7,15

^a $p<0,05$ versus CON; ^{a'} $p\leq 0,07$ versus CON; ^{a''} $p=0,09$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM; ^{b'} $p=0,06$ versus LM;

^{c'} $p=0,07$ versus LM+ALE

4.8.2 Histologia descritiva do calo ósseo

A figura 26 ilustra imagens coradas com HE. Em 12,5 vezes de aumento é possível observar, tanto nos animais controle como naqueles com lesão medular, o espaço entre os dois principais fragmentos ósseos da fratura (*gap*) e ausência de continuidade óssea no calo entre os fragmentos.

Em 50 e 200 vezes observa-se que o calo do grupo controle estava formado por algumas trabéculas e muito tecido cartilaginoso. Por outro lado, na lesão medular (com e sem tratamento) a formação do calo apresentou pouco tecido cartilaginoso, mas muitas trabéculas. Com o PTH há menor espaço entre os fragmentos ósseos.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 26: Imagens histológicas dos calos ósseos dos animais dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento. Os retângulos representam áreas com maior aumento. No controle predomina o calo ósseo externo formado por tecido ósseo jovem e áreas cartilaginosas. Nos lesados medulares (LM) há predomínio de tecido ósseo e menor área cartilaginosa. Entre os animais tratados há união sólida entre os fragmentos e tecido ósseo jovem. Coloração em HE, aumento de 12,5; 50 e 200 x

Na Figura 27 os cortes foram corados com TRAP e fotografados no aumento de 12,5 vezes. Na lesão medular não tratada (LM) houve aumento importante na quantidade de osteoclastos (representados pela coloração avermelhada), em comparação com os demais grupos.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 27: Cortes histológicos no plano coronal dos calos ósseos com coloração TRAP. A coloração avermelhada indica aumento na quantidade de osteoclastos no calo ósseo dos animais do grupo LM em comparação com os demais grupos. Aumento de 12,5 x

Na Figura 28 as lâminas foram coradas com *picro-sirius red* e fotografadas com aumento de 12,5 vezes. Na lesão medular sem tratamento houve maior deposição de colágeno em relação aos demais grupos.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 28: Cortes histológicos dos calos ósseos dos animais dos diferentes grupos. A intensidade da coloração alaranjada indica aumento na deposição de colágeno, que está reduzida nos calos ósseos dos animais paraplégicos sem tratamento em relação aos outros grupos. *Picro-sirius red* e aumento de 12,5 x

4.8.2.1 Histomorfometria do calo ósseo

A figura 29 apresenta os cortes histológicos do calo ósseo, corados com *picro-sirius red* e TRAP fotografados respectivamente em 50 e 100 vezes. Na primeira coluna, corada com *picro-sirius red*, há presença de colágeno tipo I (fibras vermelhas e alaranjadas) e tipo III (fibras verdes e amarelas). Na coloração com TRAP, a segunda coluna ilustra a atividade osteoclástica no calo ósseo de 14 dias.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 29. Ilustra os cortes histológicos do calo ósseo dos animais dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento corados com *picro-sirius red* (PICRO) e *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP), respectivamente (50x e 100x, respectivamente). A luz polarizada foi utilizada para coloração em *picro-sirius red*

A tabela 6 apresenta a histomorfometria do calo ósseo. A lesão medular reduziu a quantidade de osteoclastos (-46%, $p>0,05$), e proporcionou maior deposição de colágeno tipo III (+418) e colágeno total (+158%) em relação ao controle ($p<0,09$).

O alendronato de sódio reduziu o número de osteoclastos em -29% ($p>0,05$), a deposição de colágeno tipo III em -40% ($p=0,09$) e colágeno total em -39% ($p=0,07$).

No grupo tratado com PTH houve redução dos osteoclastos em 65% ($p>0,05$) e aumento da deposição de colágeno tipo I em 48 %, e total em 46 % ($p>0,05$).

No grupo tratado com ultrassom de baixa intensidade houve redução na quantidade de osteoclastos (-17 %, $p>0,05$), na deposição de colágeno tipo III (-85%, $p=0,07$) e aumento do colágeno tipo I (+79%, $p>0,05$).

Tabela 6- Histomorfometria do calo ósseo, área reabsortiva (TRAP), formação óssea (Masson), deposição de colágeno tipo I (Coll_1), tipo III (Coll_3) e colágeno total (Coll_total) nos grupos controle (CON), lesado medular (LM) e lesados medulares tratados (LM+ALE, LM+PTH, LM+US)

	CON	LM	LM+ALE	LM+US	LM+PTH
Calo ósseo					
(Diáfise femoral)					
TRAP (% area)	2,78 ± 1,85	1,50 ± 0,83	1,09±0,61	1,24±1,12	0,52±0,20 ^a
Coll_1 (% area)	3,96 ± 0,08	3,63 ± 2,97	2,26±1,75	7,12±3,11	5,85±2,30
Coll_3 (% area)	1,90±0,87	9,85±6,65 ^{a"}	5,94±2,42 ^b	1,51±0,81 ^{b'}	1,78±0,29
Coll_total (% area)	5,22±0,33	13,48±6,13 ^{a'}	8,20±3,57	8,63±3,00	7,63±2,27

^a $p<0,05$ versus CON; ^{a'} $p=0,07$ versus CON; ^{a"} $p=0,09$ versus CON; ^b $p<0,05$ versus LM; ^{b'} $p=0,07$ versus LM

^{c'} $p=0,07$ versus LM+ALE

4.9 Imunoistoquímica óssea

4.9.1 Imunomarcadores de RANK, RANKL e OPG na metáfise proximal da tíbia

A figura 30 apresenta os cortes submetidos ao ensaio de imunoistoquímica da metáfise proximal da tíbia, com expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL. O grupo com lesão medular apresentou redução da proteína OPG, enquanto, aumentou a marcação das proteínas RANK e RANKL em relação ao controle, acelerando a osteoclastogênese e induzindo perda óssea.

O tratamento com alendronato reduziu as proteínas OPG, RANK e RANKL. No entanto, os grupos tratados com PTH e ultrassom apresentaram maior expressão da proteína OPG comparado ao grupo lesado medular sem tratamento, influenciando diretamente na inibição da osteoclastogênese.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 30. Imagem qualitativa da metáfise proximal da tíbia dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento (LM+ALE, LM+US e LM+PTH), marcados por imunomarcagem das proteínas osteoprotegerina (OPG), receptor ativador fator nuclear kappa β (RANK) e ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β (RANKL). As setas representam a expressão das proteínas. Aumento de 200x

A tabela 7 mostra os resultados da quantificação dos imunomarcadores de OPG, RANK e RANKL. A lesão medular acelerou o processo de reabsorção óssea por meio do aumento significativo da expressão das proteínas RANK (+279%) e RANKL (+114%) responsáveis pela ativação e diferenciação dos osteoclastos ($p<0,05$).

Em contrapartida, o paratormônio foi capaz de aumentar significativamente a expressão de OPG (+215% e +220%, $p<0,05$) comparado ao grupo lesado medular e ao tratamento com alendronato, respectivamente, inibindo a osteoclastogênese.

O alendronato de sódio inibiu a expressão da proteína RANKL (-84%, $p<0,05$) em comparação ao grupo não tratado.

O ultrassom reduziu a expressão das proteínas RANK em 19% e RANKL em 19% e proporcionou aumento inversamente proporcional na expressão da proteína OPG em 71%, apesar de não haver diferença estatística, $p>0,05$.

Tabela 7-Valores médios e desvio padrão dos resultados quantitativos da imunoistoquímica da metáfise proximal da tíbia dos grupos controle (CON), lesão medular (LM) e lesão medular com tratamento (LM+ALE, LM+US e LM+PTH)

	CON	LM	LM+ALE	LM+US	LM+PTH
Proximal tibia (trabecular bone)					
RANK (% area)	0,63 $\pm$ 0,17	2,35 $\pm$ 0,16 ^a	0,91 $\pm$ 0,45	1.35 $\pm$ 0.31	3,33 $\pm$ 1,54 ^{a,c}
RANKL (% area)	0,91 $\pm$ 0,11	1,95 $\pm$ 0,46 ^a	0,26 $\pm$ 0,20 ^b	1.36 $\pm$ 0.57	1,46 $\pm$ 0,99 ^c
OPG (% area)	2,58 $\pm$ 1,01	2,17 $\pm$ 0,38	2,14 $\pm$ 1,29	3.70 $\pm$ 2.18	6,85 $\pm$ 2,75 ^{a,b,c}

^a $p<0.05$ versus CON, ^{a'} $p=0.08$ versus CON, ^b $p<0.05$ versus LM, ^c $p<0.05$ versus LM+ALE, ^{c'} $p=0.09$ versus LM+ALE

4.9.2 Imunomarcadores de RANK, RANKL e OPG no calo ósseo do fêmur

A figura 31 ilustra a expressão imunoistoquímica no calo ósseo das proteínas OPG, RANK e RANKL nos cortes histológicos submetidos ao ensaio de imunomarcção. Qualitativamente, é possível observar redução da proteína osteoprotegerina em todos os grupos com lesão medular.

Os animais com lesão medular apresentaram redução de OPG e RANKL e aumento da expressão de RANK. Os tratamentos com alendronato e PTH aumentaram a expressão de RANKL, RANK e OPG. O ultrassom aumentou a expressão de RANKL e OPG e reduziu a expressão de RANK.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 31. Cortes histológicos do calo ósseo de todos os grupos. Expressão por imunomarcção das proteínas osteoprotegerina (OPG), receptor ativador fator nuclear kappa β (RANK) e ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β (RANKL). As setas representam a expressão das proteínas. Aumento de 200x

Na tabela 8 estão os resultados da quantificação dos imunomarcadores de OPG, RANK e RANKL no calo ósseo. Nos animais paraplégicos sem tratamento, as proteínas OPG (-75%, $p<0,05$) e RANKL (-54%, $p<0,05$) foram menos expressas que no controle e RANK (+67%, $p>0,05$) foi mais expressa.

Todos os tratamentos levaram à ativação na expressão das proteínas equilibrando o sistema OPG/RANK/RANKL. O alendronato de sódio aumentou a expressão das proteínas RANKL (+221%) e OPG (+159%) em comparação com o grupo lesado medular não tratado, $p<0,05$.

O paratormônio, aumentou a expressão de RANK (+393% e +112%) comparado aos grupos LM e LM+ALE, respectivamente ($p<0,05$) e aumentou a expressão de OPG em (+72%, $p>0,05$) comparado ao grupo LM.

O ultrassom aumentou a expressão das proteínas RANKL (+20%) e OPG (+83%), $p>0,05$ em relação ao grupo lesado medular.

Tabela 8- Resultados da imunoistoquímica do calo ósseo em todos os grupos

	CON	LM	LM+ALE	LM+US	LM+PTH
Calo ósseo (fêmur)					
RANK (% area)	0,57 ± 0,21	0,95 ± 0,63	2,21±0,97	0.86±0.62	4,68±2,07 ^{a,b,c'}
RANKL (% area)	2,26 ± 0,02	1,05 ± 0,22 ^a	3,37±1,54 ^b	1.26±0.58 ^a	1,92±0,96
OPG (% area)	7,40 ± 1,56	1,87 ± 1,28 ^a	4,85±1,19 ^{a,b}	3.42±0.39 ^a	3,21±0,96 ^a

^a $p<0.05$ versus CON, ^b $p<0.05$ versus LM, ^{c'} $p=0.09$ versus LM+ALE

4.10 Resistência Mecânica

4.10.1 Análise mecânica de rigidez e força máxima da tíbia

A figura 32 mostra a comparação da força máxima e rigidez das tíbias. Nos animais paraplégicos sem tratamento (LM) houve menor força máxima e rigidez que o controle ($p<0,05$). Os tratamentos com alendronato de sódio e ultrassom foram eficazes em aumentar a resistência mecânica do tecido ($p<0,05$), já o grupo tratado com o PTH não apresentou melhora na resistência mecânica comparados com o grupo lesado medular sem tratamento.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 32. Força máxima e rigidez apresentada nos grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados (LM+ALE, LM+PTH e LM+US). A lesão medular causou redução na força máxima e na rigidez óssea nos animais paraplégicos não tratados. Os tratamentos com alendronato e ultrassom foram eficazes em reverter essa perda. ^a $p < 0,05$ versus CON; ^b $p < 0,05$ versus LM; ^c $p < 0,05$ versus LM+ALE

4.10.2 Resistência mecânica do calo ósseo

A figura 33 mostra a comparação dos parâmetros mecânicos da torção do calo ósseo, (torque máximo, rigidez e ângulo de ruptura) em todos os grupos. Nos animais paraplégicos não tratados (LM) houve diminuição do torque e ângulo de ruptura em relação ao controle ($p < 0,05$). Os tratamentos com alendronato de sódio e ultrassom foram eficazes em aumentar o torque e a resistência do tecido ($p < 0,05$).

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 33. Calo ósseo. Comparação do torque, rigidez, e ângulo de ruptura entre os grupos controle (CON), paraplégicos sem tratamento (LM), e paraplégicos tratados com alendronato (LM+ALE) e ultrassom (LM+US). Houve redução no torque e no ângulo de ruptura nos animais paraplégicos sem tratamento,

enquanto que os tratamentos com alendronato e ultrassom melhoraram esses parâmetros. ^a $p < 0,05$ versus CON; ^{a'} $p = 0,07$ versus CON; ^b $p < 0,05$ versus LM

4.11 Análise da expressão gênica óssea

4.11.1 Expressão dos genes de formação na tíbia

A figura 34 mostra a expressão relativa dos genes de formação na tíbia. A lesão medular reduziu a expressão gênica referente à osteoblastogênese. Após o tratamento com alendronato de sódio houve redução na expressão gênica de formação óssea nas diferentes fases de diferenciação e maturação osteoblástica.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 34. Expressão gênica da formação óssea na tíbia. Comparação da expressão da média normalizada dos genes *Col1a* (Colágeno tipo 1 alfa), *OSX* (*Osterix* -Fator de transcrição Sp7) e *Runx2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica), entre os grupos CON, LM, LM+ALE e LM+US no tecido ósseo intacto da tíbia. Estes genes foram normalizados com o gene endógeno *GaPDH*. ^a $p < 0.05$ versus CON

4.11.2 Expressão dos genes de formação do calo ósseo

A figura 35 mostra a comparação da expressão relativa dos genes no processo de reparação. Não houve diferença na expressão gênica entre os animais com e sem lesão medular. No entanto, o tratamento com alendronato apresentou redução expressiva em *Col1a*, marcador da fase de diferenciação de pré-osteoblasto em osteoblasto. O ultrassom apresentou tendência em aumento na expressão da collagenase.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 35. Expressão gênica dos genes de formação no calo ósseo. Comparação da expressão da média normalizada dos genes *Col1a* (Colágeno tipo 1 alfa), *OSX* (*Osterix* -Fator de transcrição Sp7) e *Runx2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica), entre os grupos. Estes genes foram normalizados com o gene endógeno *GAPDH*. ^a $p < 0.05$ versus CON, ^b $p < 0.05$ versus LM

4.12 Expressão sérica dos marcadores de formação pelo método Elisa

A tabela 9 mostra a comparação da expressão bioquímica dos anticorpos OPG e IGF1 pela análise sérica dos grupos. O alendronato de sódio, reduziu a expressão de OPG no sangue. O fator de crescimento (IGF1), não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 9- Resultados bioquímico por ensaio de imunoabsorção enzimática em todos os grupos

	CON	LM	LM+ALE	LM+US	LM+PTH
OPG (ng/ml)	1,36 ± 0,24	1,40 ± 0,48	0,74 ± 0,46 ^{a,b}	1,13 ± 0,25	0,84 ± 0,42
IGF1 (pg/ml)	0,64 ± 0,16	0,68 ± 0,28	0,63 ± 0,18	0,58 ± 0,17	0,49 ± 0,18

^a $p < 0.05$ versus CON, ^b $p < 0.05$ versus LM

Discussão

5 DISCUSSÃO

Investigamos os efeitos da lesão medular completa em ratos e constatamos redução significativa na formação óssea e aumento na atividade osteoclástica na tíbia, o que resultou em deterioração da microarquitetura trabecular e cortical, redução na densidade mineral e na resistência óssea aos esforços mecânicos. Além disso, houve alterações no processo de consolidação, durante o processo de maturação e diferenciação celular, resultando em calo ósseo com menor qualidade microestrutural, menor densidade e menor resistência mecânica.

A lesão da medula espinhal resulta em comprometimento de diversos órgãos e sistemas, dentre eles o osso, objeto deste estudo. Em virtude da regulação osteometabólica proveniente do sistema nervoso central (94), torna-se compreensível as graves alterações ósseas decorrentes das lesões medulares. O aparelho locomotor é afetado distalmente à lesão, com parestesia, paralisia, perda de sensibilidade (10-12), deformidades, retrações musculares, aumento de infiltrações adiposas e osteoporose (95). O grave acometimento ósseo fica evidente quando ocorrem fraturas, geralmente sem trauma significativo ou com trauma de baixa energia (fratura patológica) (14, 19-21). O diagnóstico da fratura é dificultado pela falta de sensibilidade do indivíduo e pelas características da fratura (22). Estudos estatísticos indicam que cerca de 70% dos indivíduos com lesão medular apresentarão fraturas por baixa energia ao longo da vida (23, 24), e o processo de consolidação nesses casos pode estar comprometido em virtude das alterações fisiológicas e estruturais (41, 96-98).

Modelos animais, apesar das limitações, são muito utilizados tanto para investigar a lesão medular, quanto à indução de osteoporose (17, 89, 99-102). Modelos animais de lesão completa da medula espinhal são utilizados na literatura científica para diversos estudos envolvendo perda de massa óssea (17, 101). Estudos prévios também investigaram terapias preventivas da perda de massa óssea induzida pela lesão medular (17, 66, 76, 101, 103). Entretanto, se a qualidade óssea é muito estudada, investigações sobre a consolidação óssea e possíveis terapias são escassas na literatura.

Nesta pesquisa investigamos os efeitos da lesão medular na perda de massa óssea e na consolidação após fratura. Além disso, adicionamos recursos medicamentosos e físicos na tentativa de minimizar os efeitos negativos no tecido ósseo causado pela paraplegia.

Com o objetivo de facilitar a leitura da tese, a discussão será apresentada em subtítulos. Desta forma, iniciaremos abordando os efeitos da lesão medular no tecido intacto e no processo de consolidação após fratura. Em seguida, serão discutidos os efeitos medicamentosos e físicos nesses processos.

5.1 Alterações na qualidade e no processo de consolidação decorrentes da lesão medular

5.1.1 Efeitos deletérios da lesão medular no osso intacto (tíbia) e no processo de consolidação (fêmur)

Mostramos que a lesão medular diminuiu significativamente a massa óssea, indicada pela redução dos marcadores de formação e aumento da atividade osteoclástica, com prejuízo da macroestrutura, microarquitetura e resistência do tecido ósseo distalmente à lesão.

As graves e deletérias alterações ósseas decorrentes da lesão medular são justificadas pelo acometimento não somente do sistema motor e sensorial, mas também do sistema nervoso autônomo (SNA), que resulta na falência do sistema nervoso simpático (SNS), com manutenção da influência do parassimpático (SNP) via nervo vago (104). Desta forma, há alteração da estabilidade hemodinâmica, vasoconstrição, níveis de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, temperatura corporal, cinesia circulatória dos membros inferiores e imobilização por falta de descarga de peso (43, 96, 104), que afetam o metabolismo ósseo.

As complicações decorrentes da lesão medular são causadas por alterações neurovasculares, que alteram os ciclos metabólicos dos tecidos, observado principalmente pelos marcadores bioquímicos e pela expressão gênica (105, 106). Nosso estudo revelou que a lesão da medula espinhal induziu redução significativa na expressão gênica dos reguladores de formação óssea. Além disso, nossos resultados de expressão gênica evidenciaram alterações em diferentes fases de diferenciação e maturação osteoblástica. A collagenase (Col1a) é expressa em estágio de pré-osteoblastos, enquanto o osterix (OSX) e o fator de transcrição 2 (Runx2) promovem a ativação em fase precoce de células progenitoras em osteoblastos (107), que influenciam diretamente na formação dos osteoblastos e no processo de formação óssea.

A baixa regulação genotípica de formação óssea afeta o remodelamento ósseo e altera a osteogênese, modificando a composição celular, com aumento da reabsorção e redução da formação óssea. Isso pode ser observado pela redução da quantidade de trabeculado ósseo, aumento do número de osteoclastos e redução do colágeno tipo 1, principal componente da matriz óssea (89). O desequilíbrio osteometabólico resultou em alterações estruturais macro e microscópicas. Em nível macroscópico houve redução de massa, perímetro e comprimento ósseo. Em nível microscópico, houve deterioração da microarquitetura trabecular e cortical, com redução do volume ósseo trabecular e cortical, e aumento do espaçamento entre as trabéculas. Ainda em nível microscópico, a lesão medular induziu alterações na atividade celular com aumento significativo na expressão de receptor ativador do fator nuclear kappa B

(RANK) e ligante receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Além disso, a densidade e o conteúdo mineral ósseo foram reduzidos, bem como a resistência do osso, com redução da rigidez e da força do tecido, aumento da fragilidade óssea e facilitação da fratura. Estes achados estão de acordo com àqueles descritos por outros autores que evidenciaram mudanças decorrentes da lesão medular tanto em estudos clínicos (13, 16, 18, 33, 41, 44), como experimentais (17, 66, 103, 108).

Em virtude das alterações sistêmicas e locais secundárias à lesão medular, todos os componentes da região abaixo da lesão sofrem alterações decorrentes dela: a pele fica atrófica, aderente e com grande propensão para a formação de úlceras que são de difícil cicatrização, os músculos perdem grande massa e são invadidos por intensa fibrose, o tecido adiposo aumenta e alterações hormonais e imunológicas ocorrem. Esses elementos sugerem que esse conjunto de alterações não são apenas decorrentes da imobilização, mas também pela desnervação em si, que leva a alterações autonômicas, e fundamentalmente, do trofismo dos tecidos (95, 96, 109, 110).

Devido à grave deterioração decorrente do trauma medular, o processo de consolidação também está comprometido. Em nosso estudo, observamos que a consolidação inicial em ratos paraplégicos ocorreu predominantemente por formação intramembranosa enquanto que nos controles houve predomínio da formação endocondral (102). A consolidação endocondral ocorre com formação inicial de tecido cartilaginoso e diferenciação em tecido ósseo. A consolidação intramembranosa ocorre com formação de tecido ósseo pela via intramembranosa, com diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, que sintetizam a matriz óssea e que rapidamente se calcifica. Sabe-se que as mudanças genéticas, hormonais e a hiperreflexia simpática após o trauma na medula alteram o fenótipo do processo de reparo ósseo (39, 111), o que justifica nossos achados. Da mesma forma, o método de estabilização da fratura também influencia no tipo de consolidação óssea. Neste estudo, utilizamos a fixação com haste intramedular, método comumente utilizado na literatura (99, 100, 112-114). Sabe-se que a estabilização com haste intramedular apresenta algumas limitações, pois não oferece resistência à torção e ao suporte passivo de peso (115). Desta forma, a falta de descarga de peso induzida pela lesão medular pode ter contribuído para a alteração no padrão de consolidação (102).

Em face da consolidação ser intramembranosa, houve presença externa de tecido trabeculado e pouco tecido cartilaginoso nos calos ósseos dos ratos paraplégicos. Nos animais controle encontramos grande quantidade de tecido cartilaginoso e poucas trabéculas. O *gap* entre os fragmentos ósseos foi observado nos dois grupos, bem como a ausência de pontes ósseas completas. Nossas imagens microtomográficas e resultados morfométricos mostraram

alterações na microarquitetura do calo ósseo dos animais paraplégicos que, apesar de apresentarem maior número de trabéculas, elas foram mais delgadas e o calo foi mais poroso. Ainda em nível microscópico, a lesão medular causou alterações na atividade celular do calo ósseo, com redução significativa na expressão de osteoprotegerina (OPG) e ligante receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Por outro lado, os resultados séricos de expressão proteica de OPG e IGF1 em nível sistêmico não apresentaram diferenças entre os grupos com e sem lesão medular. Relatos clínicos prévios mostraram que lesões neurológicas podem induzir aumento nos fatores de crescimento, como níveis séricos de IGF1. Embora nossos resultados não tenham mostrado diferença significativa, essa alteração pode contribuir para a mudança no tipo de ossificação nos animais paraplégicos (116, 117). Apesar da alteração da expressão local do mecanismo OPG/RANKL, a expressão sistêmica não foi alterada, talvez na tentativa de criar um ambiente de compensação para a consolidação óssea mesmo em um ambiente tão microdeteriorado.

Além disso, encontramos calos menos densos nos animais paraplégicos que, somadas às alterações já apresentadas, resultaram em calos enfraquecidos, menos resistentes em torque e ângulo de ruptura. Confirmando nossos achados, estudos experimentais prévios mostraram que os calos ósseos neoformados em animais paraplégicos são deficientes em resistência mecânica, densidade mineral e aspectos morfológicos (99-101). Assim, a neoformação óssea deficiente pode predispor à recidiva de fraturas e, portanto, estudos abordando terapias medicamentosas e/ou recursos físicos e mecânicos têm grande e importante impacto clínico.

5.2 Terapia medicamentosa no tecido ósseo e na consolidação pós-fratura: alendronato de sódio e paratormônio

Recursos terapêuticos medicamentosos são utilizados clinicamente na prevenção da perda de massa óssea há muitos anos. No entanto, o uso desses medicamentos no processo de consolidação não está completamente elucidado. Novos medicamentos são produzidos constantemente na tentativa de recuperar a estrutura e função ósseas. Deste modo, abordaremos os efeitos de dois medicamentos: o alendronato de sódio, um bisfosfonato utilizado há décadas, de fácil acesso e baixo custo; e o paratormônio, um hormônio com disponibilidade recente e de custo elevado.

Nossos achados mostraram que tanto o alendronato de sódio como o PTH foram eficazes em recuperar a qualidade do tecido ósseo não fraturado e do calo ósseo. No entanto, os mecanismos de atuação são bem distintos e os efeitos em longo prazo podem ser diferentes dos apresentados neste estudo.

O alendronato de sódio, um potente inibidor da reabsorção óssea, reduziu significativamente a expressão da proteína RANKL nas tíbias dos animais paraplégicos. Com isso, a quantidade de osteoclastos presentes nas tíbias dos animais paraplégicos tratados foi reduzida de forma significativa, confirmando estudos anteriores (118, 119). Nossos resultados de expressão gênica mostraram que o alendronato não interferiu na redução da expressão dos genes relacionados à formação óssea em nenhuma das etapas de diferenciação e maturação osteoblástica. Este resultado já era esperado uma vez que a atuação do alendronato como droga anti-osteoporótica limita-se à supressão na reabsorção óssea (120, 121). A inibição da reabsorção óssea causada pelo alendronato, resultou em alterações significativas na microarquitetura trabecular e cortical, densitométricas e mecânicas. Verificamos aumento no volume ósseo trabecular e cortical, na espessura trabecular e cortical, na quantidade de trabéculas e na conectividade entre elas, além da redução no espaçamento entre as trabéculas e na porosidade. Reforçando estes achados, estudos clínicos mostraram melhora da densidade mineral óssea em pacientes com lesão medular em uso de alendronato (61, 122-124). No entanto, cabe aqui ressaltar diversos estudos mostrando fraturas atípicas em indivíduos em uso prolongado de bisfosfonatos (125, 126) e hiperostose mandibular, de forma a ser necessária interrupção do tratamento (21). O presente estudo mostra resultados positivos do alendronato quando administrado em curto prazo, confirmando estudos experimentais prévios (127, 128). No entanto, esses resultados não podem ser extrapolados para uso prolongado.

A atuação do alendronato na consolidação óssea parece ter intensificado a ossificação intramembranosa, uma vez que aumentou ainda mais a quantidade de trabéculas e reduziu a quantidade de tecido cartilaginoso para quase ausência. O aumento no número de trabéculas foi resultante da supressão na reabsorção óssea, uma vez que o uso do fármaco reduziu a expressão gênica da collagenase 1a, responsável pela diferenciação do osteoblasto (129, 130). A inibição osteoclástica causada pelo alendronato, provocou alterações na regulação da osteoclastogênese pelo mecanismo de interação RANK/RANKL/OPG, com inibição da ativação e diferenciação dos osteoclastos pelo aumento significativo de OPG/RANKL, apesar de sistemicamente reduzir a expressão sérica de OPG (131). O efeito do medicamento parece ter exercido efeito positivo na microarquitetura, na densidade e na resistência mecânica do calo, mas não na elasticidade. Microestruturalmente, houve aumento no volume, na quantidade de trabéculas e na conectividade entre elas, com redução do espaçamento entre as trabéculas e, conseqüentemente, na porosidade. O tratamento farmacológico também aumentou a densidade mineral óssea do calo, mas reduziu a deposição de colágeno, que em longo prazo pode ser prejudicial para a função do tecido ósseo. A conclusão quanto ao efeito positivo ou negativo do alendronato deve

ser bastante cautelosa, uma vez que houve alteração expressiva no microambiente ósseo que, em primeiro momento parece ter sido benéfica, mas que, em longo prazo pode resultar em danos irreparáveis. Estudos futuros com maior tempo de seguimento poderão elucidar essa dúvida, que já foi questionada por outros autores (47, 50-53, 129, 132-134).

O paratormônio, um regulador da homeostase do cálcio e estimulador da formação óssea pela osteoblastogênese, trouxe efeitos benéficos para o tecido e cicatrização dos ossos gravemente deteriorados pela lesão medular. O tratamento com PTH aumentou a expressão de osteoprotegerina, reduzindo a ação reabsortiva dos osteoclastos. Como resultado, houve melhora significativa na microarquitetura óssea, tanto no osso lamelar quanto no trabecular, com aumento da densidade óssea, conforme observado anteriormente em estudo prévio com mulheres com supressão de estrogênio (135). Diferentemente do uso do alendronato, o PTH foi capaz de aumentar a densidade tecidual do osso cortical, possivelmente devido à sua atuação anabólica em induzir neoformação óssea na superfície intracortical (136, 137). Além disso, o PTH melhorou o equilíbrio ósseo reduzindo a reabsorção óssea dos osteoclastos e aumentando a síntese de colágenos, com melhora da resistência mecânica do osso. Infelizmente, não conseguimos realizar a análise molecular dos ossos e mecânica do calo ósseo em função da quantidade restrita de animais paraplégicos destinados ao caro tratamento com PTH. Acreditamos que os achados mecânicos demonstrariam melhora tanto na resistência como resiliência óssea devido ao uso do tratamento farmacológico. Nossos achados confirmam trabalhos anteriores que também identificaram efeitos positivos com o uso do PTH (63), tanto em estudos experimentais (138), como clínicos (135).

No processo de consolidação óssea, a atuação do PTH tanto na formação como na reabsorção resultou em calos ósseos com melhor organização estrutural, pontes ósseas bem formadas e definidas, trabéculas mais espessas e menor porosidade. O uso desse medicamento inibiu a ativação dos osteoclastos, aumentando a expressão de OPG. Os resultados microtomográficos demonstraram que, diferentemente do tratamento com alendronato, o PTH aumentou a espessura das trabéculas, o que pode produzir calos ósseos mais resistentes e resilientes. Estudos prévios mostraram que o uso prolongado do PTH proporcionou efeitos positivos em ossos normais de animais (139, 140) ou osteoporóticos, por supressão de estrogênio (141, 142). Com isso, sugerimos que as melhoras apresentadas neste estudo podem ser extrapoladas para tratamentos prolongados com paratormônio.

Comparativamente, tanto o alendronato como o PTH apresentaram resultados positivos na qualidade do tecido ósseo não fraturado no período analisado. Considerando a atuação mais fisiológica do PTH e os efeitos potencialmente nocivos do alendronato em longo prazo, o PTH

mostrou-se mais eficaz que o alendronato para restaurar a qualidade óssea em animais paraplégicos. Da mesma forma e com mais impacto, o PTH também se mostrou superior ao alendronato durante a consolidação óssea, com formação de calos com melhor microarquitetura e atividade celular.

5.3 O ultrassom de baixa intensidade no tecido ósseo e na consolidação pós-fratura

O ultrassom de baixa intensidade foi utilizado diretamente na fratura do fêmur, ou seja, o calo ósseo foi estudado pelos efeitos diretos das ondas ultrassônicas, enquanto que a tíbia foi estudada pelos efeitos indiretos, pela propagação das ondas. Os benefícios observados na tíbia ocorreram devido à propagação de energia como onda de pressão produzindo tensões e deformações em áreas adjacentes (71). O ultrassom exerceu efeitos positivos principalmente no osso lamelar e inibiu o sistema de reabsorção ósseo.

Os benefícios dos recursos físicos são estudados há anos. Alguns autores mostraram que o estímulo mecânico aplicado em ossos osteoporóticos intactos protege a perda de massa óssea e a microdeterioração (74, 75, 80, 87, 143). Em contrapartida, o uso do ultrassom não apresentou melhora na qualidade de ossos curtos em pacientes com lesão medular (144).

Em nosso estudo, mostramos que os genes relacionados à formação óssea apresentaram tendência em aumento de expressão: houve aumento não significativo de 230% para *Col1a*, de 89% para *Osx* e de 139% para *Runx2*. O estímulo mecânico transforma as microdeformações do osso em ondas de pressão interna que são ampliadas pelos líquidos do sistema canalicular e chegam a várias células ósseas mecanossensíveis, principalmente no osteócito. O ultrassom reduziu a quantidade de osteoclastos, aumentada devido à paraplegia. Com isso, houve relevante melhora na região cortical, que foi diretamente beneficiada com aumento do volume e rigidez mecânica.

No processo de consolidação o ultrassom apresentou tendência estatística em aumentar a expressão dos genes *col1a* e *runx2*, responsáveis pela osteoblastogênese. Além disso, o aumento da expressão de *OPG* inibiu a ativação osteoclástica, resultando em calos ósseos com pontes ósseas mais espessas e próximas, aumento no número e organização das trabéculas, com maior conexão entre elas; maior densidade óssea do calo e maior resistência e resiliência mecânica. Alguns autores já mostraram a eficácia do uso do ultrassom na melhora do processo de consolidação em diferentes situações experimentais (80-83, 145) e clínicas (75, 84-86, 146), o que confirma nossos achados.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A lesão medular alterou os mecanismos do processo de consolidação óssea, com prejuízo da qualidade do calo ósseo da fratura. As terapias medicamentosas (alendronato de sódio e paratormônio) e física (ultrassom de baixa intensidade) foram eficazes em minimizar as deteriorações causadas pela lesão medular no calo ósseo.

A lesão medular induziu a deterioração óssea devido ao aumento de reabsorção e diminuição da formação do tecido ósseo. Os tratamentos foram eficazes em minimizar e reverter os danos causados pela lesão medular nos ossos não fraturados.

Referências

REFERÊNCIAS⁷

1. Cruz CD, Coelho A, Antunes-Lopes T, Cruz F. Biomarkers of spinal cord injury and ensuing bladder dysfunction. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;82-83:153-9.
2. Edokpolo LU, Foster HE, Jr. Renal tract ultrasonography for routine surveillance in spinal cord injury patients. *Top Spinal Cord Inj Rehabil.* 2013;19(1):54-60.
3. Ozisler Z, Koklu K, Ozel S, Unsal-Delialioglu S. Outcomes of bowel program in spinal cord injury patients with neurogenic bowel dysfunction. *Neural Regen Res.* 2015;10(7):1153-8.
4. Hoh DJ, Mercier LM, Hussey SP, Lane MA. Respiration following spinal cord injury: evidence for human neuroplasticity. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;189(2):450-64.
5. Bauman WA, Spungen AM. Coronary heart disease in individuals with spinal cord injury: assessment of risk factors. *Spinal Cord.* 2008;46(7):466-76.
6. Hwang M, Zebracki K, Chlan KM, Vogel LC. Longitudinal changes in medical complications in adults with pediatric-onset spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2014;37(2):171-8.
7. Kovindha A, Kammuang-Lue P, Prakongsai P, Wongphan T. Prevalence of pressure ulcers in Thai wheelchair users with chronic spinal cord injuries. *Spinal Cord.* 2015;53(10):767-71.
8. Peterson MJ, Kahn JA, Kerrigan MV, Gutmann JM, Harrow JJ. Pressure ulcer risk of patient handling sling use. *J Rehabil Res Dev.* 2015;52(3):291-300.
9. Lo V, Esquenazi Y, Han MK, Lee K. Critical care management of patients with acute spinal cord injury. *J Neurosurg Sci.* 2013;57(4):281-92.
10. Baligand C, Chen YW, Ye F, Pandey SN, Lai SH, Liu M, et al. Transcriptional Pathways Associated with Skeletal Muscle Changes after Spinal Cord Injury and Treadmill Locomotor Training. *Biomed Res Int.* 2015;2015:387090.
11. Butezloff MM, Zamarioli A, Maranhão DA, Shimano AC. Effect of Electrical Stimulation and Vibration Therapy on Skeletal Muscle Trophism in Rats with Complete Spinal Cord Injury. *Am J Phys Med Rehabil.* 2015;94(11):950-7.
12. Cho KH, Nam JH. Evaluation of Stiffness of the Spastic Lower Extremity Muscles in Early Spinal Cord Injury by Acoustic Radiation Force Impulse Imaging. *Ann Rehabil Med.* 2015;39(3):393-400.
13. Bauman WA, Cardozo CP. Osteoporosis in individuals with spinal cord injury. *PM R.* 2015;7(2):188-201; quiz
14. Edwards WB, Schnitzer TJ. Bone Imaging and Fracture Risk after Spinal Cord Injury. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(5):310-7.
15. Sugawara H, Linsenmeyer TA, Beam H, Parsons JR. Mechanical properties of bone in a paraplegic rat model. *J Spinal Cord Med.* 1998;21(4):302-8.

---

⁷ De acordo com Estilo Vancouver

16. Varzi D, Coupaud SA, Purcell M, Allan DB, Gregory JS, Barr RJ. Bone morphology of the femur and tibia captured by statistical shape modelling predicts rapid bone loss in acute spinal cord injury patients. *Bone*. 2015;81:495-501.
17. Zamarioli A, Maranhão DA, Butezloff MM, Moura PA, Volpon JB, Shimano AC. Anatomic changes in the macroscopic morphology and microarchitecture of denervated long bone tissue after spinal cord injury in rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:853159.
18. Giangregorio L, McCartney N. Bone loss and muscle atrophy in spinal cord injury: epidemiology, fracture prediction, and rehabilitation strategies. *J Spinal Cord Med*. 2006;29(5):489-500.
19. Frotzler A, Cheikh-Sarraf B, Pourtehrani M, Krebs J, Lippuner K. Long-bone fractures in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2015;53(9):701-4.
20. Nottage WM. A review of long-bone fractures in patients with spinal cord injuries. *Clin Orthop Relat Res*. 1981(155):65-70.
21. Zehnder Y, Luthi M, Michel D, Knecht H, Perrelet R, Neto I, et al. Long-term changes in bone metabolism, bone mineral density, quantitative ultrasound parameters, and fracture incidence after spinal cord injury: a cross-sectional observational study in 100 paraplegic men. *Osteoporos Int*. 2004;15(3):180-9.
22. Ragnarsson KT. Bone loss and fractures in limbs paralyzed by spinal cord injury: Prevention, diagnosis, and treatment. *J Spinal Cord Med*. 2015;38(1):10-2.
23. Battaglini RA, Lazzari AA, Garshick E, Morse LR. Spinal cord injury-induced osteoporosis: pathogenesis and emerging therapies. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(4):278-85.
24. Logan WC, Jr., Sloane R, Lyles KW, Goldstein B, Hoenig HM. Incidence of fractures in a cohort of veterans with chronic multiple sclerosis or traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(2):237-43.
25. Yang H, Trbovich M, Harrow J. Secondary adrenal insufficiency after glucocorticosteroid administration in acute spinal cord injury: a case report. *J Spinal Cord Med*. 2014;37(6):786-90.
26. Junqueira LC, Carneiro, J. *Histologia Básica*. 10 ed: Guanabara Koogan; 2004.
27. Mundy GR. Pathogenesis of osteoporosis and challenges for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;42(3):165-73.
28. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):E1.
29. Coronho V. PA, Santana E.M., Pimenta L.G. *Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
30. Lindsay R. Prevention and treatment of osteoporosis. *Lancet*. 1993;341(8848):801-5.
31. Lazo MG, Shirazi P, Sam M, Giobbie-Hurder A, Blacconiere MJ, Muppidi M. Osteoporosis and risk of fracture in men with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2001;39(4):208-14.
32. Schulte LM, Scully RD, Kappa JE. Management of Lower Extremity Long-bone Fractures in Spinal Cord Injury Patients. *J Am Acad Orthop Surg*. 2017;25(9):e204-e13.
33. Garland DE, Stewart CA, Adkins RH, Hu SS, Rosen C, Liotta FJ, et al. Osteoporosis after spinal cord injury. *J Orthop Res*. 1992;10(3):371-8.

34. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest.* 2000;106(10):1203-4.
35. Saraiva G.L. L-CM. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002. 72-8 p.
36. Merloz P. Macroscopic and microscopic process of long bone fracture healing. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):1999-2001.
37. Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):2003-6.
38. Giannotti S, Bottai V, Pini E, Dell'osso G, De Paola G, Guido G. Clinical and surgical approach of severe bone fragility fracture: clinical case of 4 fragility fracture in patient with heavy osteoporosis. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2013;10(1):52-5.
39. Ragnarsson KT, Sell GH. Lower extremity fractures after spinal cord injury: a retrospective study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1981;62(9):418-23.
40. Jiang SD, Dai LY, Jiang LS. Osteoporosis after spinal cord injury. *Osteoporos Int.* 2006;17(2):180-92.
41. Gifre L, Vidal J, Carrasco JL, Muxi A, Portell E, Monegal A, et al. Risk factors for the development of osteoporosis after spinal cord injury. A 12-month follow-up study. *Osteoporos Int.* 2015;26(9):2273-80.
42. Sobel M, Lyden JP. Long bone fracture in a spinal-cord-injured patient: complication of treatment--a case report and review of the literature. *J Trauma.* 1991;31(10):1440-4.
43. Morse LR, Battaglini RA, Stolzmann KL, Hallett LD, Waddimba A, Gagnon D, et al. Osteoporotic fractures and hospitalization risk in chronic spinal cord injury. *Osteoporos Int.* 2009;20(3):385-92.
44. Karapolat I, Karapolat HU, Kirazli Y, Capaci K, Akkoc Y, Kumanlioglu K. Longitudinal study of bone loss in chronic spinal cord injury patients. *J Phys Ther Sci.* 2015;27(5):1429-33.
45. Kumar R, Lim J, Mekary RA, Rattani A, Dewan MC, Sharif SY, et al. Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurg.* 2018;113:e345-e63.
46. Howie DW, Vernonroberts B, Oakeshott R, Manthey B. A Rat Model of Resorption of Bone at the Cement-Bone Interface in the Presence of Polyethylene Wear Particles. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70A(2):257-63.
47. Kates SL, Ackert-Bicknell CL. How do bisphosphonates affect fracture healing? *Injury.* 2016;47:S65-S8.
48. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.* 1991;88(6):2095-105.
49. Jorgensen NR, Schwarz P. Effects of anti-osteoporosis medications on fracture healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2011;9(3):149-55.
50. Fu LJ, Tang TT, Hao YQ, Dai KR. Long-term effects of alendronate on fracture healing and bone remodeling of femoral shaft in ovariectomized rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(3):387-92.

51. Nagahama K, Kanayama M, Togawa D, Hashimoto T, Minami A. Does alendronate disturb the healing process of posterior lumbar interbody fusion? A prospective randomized trial Clinical article. *J Neurosurg-Spine*. 2011;14(4):500-7.
52. Nakao S, Minamide A, Kawakami M, Boden SD, Yoshida M. The Influence of Alendronate on Spine Fusion in an Osteoporotic Animal Model. *Spine*. 2011;36(18):1446-52.
53. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1545-50.
54. Egol KA, Park JH, Rosenberg ZS, Peck V, Tejawani NC. Healing Delayed But Generally Reliable After Bisphosphonate-associated Complete Femur Fractures Treated with IM Nails. *Clin Orthop Relat R*. 2014;472(9):2728-34.
55. Rozental TD, Vazquez MA, Chacko AT, Ayogu N, Bouxsein ML. Comparison of radiographic fracture healing in the distal radius for patients on and off bisphosphonate therapy. *J Hand Surg Am*. 2009;34(4):595-602.
56. Saito M, Shiraishi A, Ito M, Sakai S, Hayakawa N, Mihara M, et al. Comparison of effects of alfacalcidol and alendronate on mechanical properties and bone collagen cross-links of callus in the fracture repair rat model. *Bone*. 2010;46(4):1170-9.
57. Sloan AV, Martin JR, Li S, Li JL. Parathyroid hormone and bisphosphonate have opposite effects on stress fracture repair. *Bone*. 2010;47(2):235-40.
58. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2007;22(6):867-76.
59. Matos MA, Araujo FP, Paixao FB. The effect of zoledronate on bone remodeling during the healing process. *Acta Cir Bras*. 2007;22(2):115-9.
60. McDonald MM, Dulai S, Godfrey C, Amanat N, Sztynka T, Little DG. Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling. *Bone*. 2008;43(4):653-62.
61. Chang KV, Hung CY, Chen WS, Lai MS, Chien KL, Han DS. Effectiveness of bisphosphonate analogues and functional electrical stimulation on attenuating post-injury osteoporosis in spinal cord injury patients- a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(11):e81124.
62. Ellegaard M, Kringelbach T, Syberg S, Petersen S, Beck Jensen JE, Bruel A, et al. The effect of PTH(1-34) on fracture healing during different loading conditions. *J Bone Miner Res*. 2013;28(10):2145-55.
63. Hegde V, Jo JE, Andreopoulou P, Lane JM. Effect of osteoporosis medications on fracture healing. *Osteoporos Int*. 2016;27(3):861-71.
64. Oliveira JHAdB, Oswaldo Luís; Kayath, Marcia; Guarniero, Roberto. Teriparatida (PTH[1-34]rh): Uma nova perspectiva no tratamento da osteoporose. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2003;11(3).
65. Collinge C, Favela J. Use of teriparatide in osteoporotic fracture patients. *Injury*. 2016;47:S36-S8.

66. Zamarioli A, Battaglino RA, Morse LR, Sudhakar S, Maranhão DA, Okubo R, et al. Standing frame and electrical stimulation therapies partially preserve bone strength in a rodent model of acute spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil*. 2013;92(5):402-10.
67. Xie LQ, Rubin C, Judex S. Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. *J Appl Physiol*. 2008;104(4):1056-62.
68. Fukada Eiichi YI. On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the physical Society of Japan*. 1957;12(10):1158-62.
69. Paterson D. Treatment of nonunion with a constant direct current: a totally implantable system. *Orthop Clin North Am*. 1984;15(1):47-59.
70. Bassett CA. The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. *Orthop Clin North Am*. 1984;15(1):61-87.
71. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1983;101(3):153-9.
72. Xavier CMD, L.R. Estimulação ultra-sonica do calo osseo. Aplicação clinica. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 1983;18(3):73-80.
73. de Sousa VL, de Alvarenga J, Filho JGP, Canola JC, Ferrigno CRA, Alves JM, et al. Low-intensity pulsed ultrasound in diaphyseal fractures: clinical application in dogs. *Cienc Rural*. 2008;38(4):1030-7.
74. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound - A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79A(7):961-73.
75. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(1):26-34.
76. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res*. 2001;16(4):671-80.
77. Dyson M, Brookes M. Stimulation of bone repair by ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 1983;Suppl 2:61-6.
78. Mayr E, Laule A, Suger G, Ruter A, Claes L. Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound. *J Orthop Trauma*. 2001;15(6):407-14.
79. Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, et al. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma*. 1990;4(3):246-53.
80. Poliachik SL, Khokhlova TD, Wang YN, Simon JC, Bailey MR. Pulsed focused ultrasound treatment of muscle mitigates paralysis-induced bone loss in the adjacent bone: a study in a mouse model. *Ultrasound Med Biol*. 2014;40(9):2113-24.
81. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med*. 2001;20(3):197-205.

82. Volpon JB, Mota FC, Beletti ME. Low-intensity ultrasound application in distal radius metaphyseal bone defects of dogs. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(11):1849-55.
83. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res*. 1996;14(5):802-9.
84. Cook SD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Heckman JD, Kristiansen TK. Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clin Orthop Relat Res*. 1997(337):198-207.
85. Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH. Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2004;30(3):389-95.
86. Liu Y, Wei X, Kuang Y, Zheng Y, Gu X, Zhan H, et al. Ultrasound treatment for accelerating fracture healing of the distal radius. A control study. *Acta Cir Bras*. 2014;29(11):765-70.
87. Carvalho DC, Cliquet Junior A. The action of low-intensity pulsed ultrasound in bones of osteopenic rats. *Artif Organs*. 2004;28(1):114-8.
88. Tufik MLAS. Animal models as tools in ethical biomedical research 2010.
89. Morse L, Teng YD, Pham L, Newton K, Yu D, Liao WL, et al. Spinal cord injury causes rapid osteoclastic resorption and growth plate abnormalities in growing rats (SCI-induced bone loss in growing rats). *Osteoporos Int*. 2008;19(5):645-52.
90. Volpon JB, Cecim PES, Miyase CI, Gava NF. Alendronate sodium to prevent osteopenia caused by cast immobilization in female rats: histomorphometric evaluation. *Rev Bras Ortop*. 2008;43(10).
91. Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(8):2179-93.
92. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86.
93. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610.
94. Karsenty G. The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrin Met*. 2000;11(10):437-9.
95. Moore CD, Craven BC, Thabane L, Laing AC, Frank-Wilson AW, Kontulainen SA, et al. Lower-extremity muscle atrophy and fat infiltration after chronic spinal cord injury. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2015;15(1):32-41.
96. Khallaf FG, Kehinde EO, Mostafa A. Growth factors and cytokines in patients with long bone fractures and associated spinal cord injury. *J Orthop*. 2016;13(2):69-75.
97. Wang L, Liu L, Pan Z, Zeng Y. Serum leptin, bone mineral density and the healing of long bone fractures in men with spinal cord injury. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015;15(4):69-74.
98. Grassner L, Klein B, Maier D, Buhren V, Vogel M. Lower extremity fractures in patients with spinal cord injury Characteristics, outcome and risk factors for non-unions. *J Spinal Cord Med*. 2017:1-8.

99. Ding WG, Jiang SD, Zhang YH, Jiang LS, Dai LY. Bone loss and impaired fracture healing in spinal cord injured mice. *Osteoporos Int.* 2011;22(2):507-15.
100. Ding WG, Liu JB, Wei ZX. Spinal Cord Injury Causes More Damage to Fracture Healing of Later Phase than Ovariectomy in Young Mice. *Connective Tissue Research.* 2012;53(2):142-8.
101. Medalha CC, Santos AL, Veronez Sde O, Fernandes KR, Magri AM, Renno AC. Low level laser therapy accelerates bone healing in spinal cord injured rats. *J Photochem Photobiol B.* 2016;159:179-85.
102. Sakitani N, Iwasawa H, Nomura M, Miura Y, Kuroki H, Ozawa J, et al. Mechanical Stress by Spasticity Accelerates Fracture Healing After Spinal Cord Injury. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(4):384-95.
103. Zamarioli A, Battaglino R, Morse L, Okubo R, Maranhão D, Shimano AC. Passive Standing and Functional Electrical Stimulation Preserves Bone Strength in Paraplegic Rats Following Acute Spinal Cord Injury. *Osteoporosis Int.* 2012;23:S415-S6.
104. Taylor JA. Autonomic consequences of spinal cord injury. *Auton Neurosci.* 2018;209:1-3.
105. Jiang SD, Jiang LS, Dai LY. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats. *Osteoporos Int.* 2007;18(3):339-49.
106. Maimoun L, Couret I, Micallef JP, Peruchon E, Mariano-Goulart D, Rossi M, et al. Use of bone biochemical markers with dual-energy X-ray absorptiometry for early determination of bone loss in persons with spinal cord injury. *Metabolism.* 2002;51(8):958-63.
107. Zhou H, Cooper MS, Seibel MJ. Endogenous Glucocorticoids and Bone. *Bone Res.* 2013;1(2):107-19.
108. Liu M, Wu X, Tong M, Wu X, Zhou J. Impacts of Ultra-early Hyperbaric Oxygen Therapy on Bone Mass of Rats With Complete Spinal Cord Transection. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016;41(14):E837-43.
109. Qin W, Bauman WA, Cardozo C. Bone and muscle loss after spinal cord injury: organ interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1211:66-84.
110. Gorgey AS, Dudley GA. Skeletal muscle atrophy and increased intramuscular fat after incomplete spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2007;45(4):304-9.
111. Wang L, Yao X, Xiao L, Tang X, Ding H, Zhang H, et al. The effects of spinal cord injury on bone healing in patients with femoral fractures. *J Spinal Cord Med.* 2014;37(4):414-9.
112. Wang L, Tang X, Zhang H, Yuan J, Ding H, Wei Y. Elevated leptin expression in rat model of traumatic spinal cord injury and femoral fracture. *J Spinal Cord Med.* 2011;34(5):501-9.
113. Aro H, Eerola E, Aho AJ. Fracture healing in paraplegic rats. *Acta Orthop Scand.* 1985;56(3):228-32.
114. Aro H, Eerola E, Aho AJ, Penttinen R. Healing of experimental fractures in the denervated limbs of the rat. *Clin Orthop Relat Res.* 1981(155):211-7.

115. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998(355 Suppl):S7-21.
116. Moghaddam A, Sperl A, Heller R, Kunzmann K, Graeser V, Akbar M, et al. Elevated Serum Insulin-Like Growth Factor 1 Levels in Patients with Neurological Remission after Traumatic Spinal Cord Injury. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159764.
117. Ferbert T, Child C, Graeser V, Swing T, Akbar M, Heller R, et al. Tracking Spinal Cord Injury: Differences in Cytokine Expression of IGF-1, TGF-B1, and sCD95I Can Be Measured in Blood Samples and Correspond to Neurological Remission in a 12-Week Follow-Up. *J Neurotraum*. 2017;34(3):607-14.
118. Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner*. 1986;1(1):27-39.
119. Lowik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Treslong-De Groot HB, Bijvoet OL. Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res*. 1988;3(2):185-92.
120. Fuchs RK, Faillace ME, Allen MR, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB. Bisphosphonates do not alter the rate of secondary mineralization. *Bone*. 2011;49(4):701-5.
121. Sims NA, Ng KW. Implications of osteoblast-osteoclast interactions in the management of osteoporosis by antiresorptive agents denosumab and odanacatib. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12(1):98-106.
122. Moran de Brito CM, Battistella LR, Saito ET, Sakamoto H. Effect of alendronate on bone mineral density in spinal cord injury patients: a pilot study. *Spinal Cord*. 2005;43(6):341-8.
123. Zehnder Y, Risi S, Michel D, Knecht H, Perrelet R, Kraenzlin M, et al. Prevention of bone loss in paraplegics over 2 years with alendronate. *J Bone Miner Res*. 2004;19(7):1067-74.
124. Gilchrist NL, Frampton CM, Acland RH, Nicholls MG, March RL, Maguire P, et al. Alendronate prevents bone loss in patients with acute spinal cord injury: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(4):1385-90.
125. Giusti A, Hamdy NA, Dekkers OM, Ramautar SR, Dijkstra S, Papapoulos SE. Atypical fractures and bisphosphonate therapy: a cohort study of patients with femoral fracture with radiographic adjudication of fracture site and features. *Bone*. 2011;48(5):966-71.
126. Sellmeyer DE. Atypical fractures as a potential complication of long-term bisphosphonate therapy. *JAMA*. 2010;304(13):1480-4.
127. Shimizu T, Tanaka T, Kobayashi T, Kudo I, Nakatsugawa M, Takakura A, et al. Sequential treatment with zoledronic acid followed by teriparatide or vice versa increases bone mineral density and bone strength in ovariectomized rats. *Bone Rep*. 2017;7:70-82.
128. Ye T, Cao P, Qi J, Zhou Q, Rao DS, Qiu S. Protective effect of low-dose risedronate against osteocyte apoptosis and bone loss in ovariectomized rats. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186012.
129. Hauser M, Siegrist M, Keller I, Hofstetter W. Healing of fractures in osteoporotic bones in mice treated with bisphosphonates - A transcriptome analysis. *Bone*. 2018;112:107-19.

130. Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Melguizo-Rodriguez L, Illescas-Montes R, Ruiz C, Garcia-Martinez O. Bisphosphonate Modulation of the Gene Expression of Different Markers Involved in Osteoblast Physiology: Possible Implications in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Int J Med Sci.* 2018;15(4):359-67.
131. Reyes-Garcia R, Munoz-Torres M, Garcia DF, Mezquita-Raya P, Salcedo JAG, Luna JD. Effects of alendronate treatment on serum levels of osteoprotegerin and total receptor activator of nuclear factor kappa B in women with postmenopausal osteoporosis. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society.* 2010;17(1):140-4.
132. Larsson S, Fazzalari NL. Anti-osteoporosis therapy and fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2014;134(2):291-7.
133. Xue D, Li F, Chen G, Yan S, Pan Z. Do bisphosphonates affect bone healing? A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res.* 2014;9:45.
134. Uchiyama S, Itsubo T, Nakamura K, Fujinaga Y, Sato N, Imaeda T, et al. Effect of early administration of alendronate after surgery for distal radial fragility fracture on radiological fracture healing time. *Bone Joint J.* 2013;95-B(11):1544-50.
135. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001;344(19):1434-41.
136. Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang JY, Shin CS, et al. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10):2075-84.
137. Vrahnas C, Buenzli PR, Pearson TA, Pennypacker BL, Tobin MJ, Bamberg KR, et al. Differing Effects of Parathyroid Hormone, Alendronate, and Odanacatib on Bone Formation and on the Mineralization Process in Intracortical and Endocortical Bone of Ovariectomized Rabbits. *Calcif Tissue Int.* 2018.
138. Friedl G, Turner RT, Evans GL, Dobnig H. Intermittent parathyroid hormone (PTH) treatment and age-dependent effects on rat cancellous bone and mineral metabolism. *J Orthop Res.* 2007;25(11):1454-64.
139. Manabe T, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Iwata K, Komatsubara S, et al. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone.* 2007;40(6):1475-82.
140. Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone.* 2005;37(5):711-9.
141. Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmsich S, et al. Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone.* 2010;47(3):480-92.
142. Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. *Bone.* 2008;42(1):90-7.
143. Yang RS, Chen YZ, Huang TH, Tang CH, Fu WM, Lu BY, et al. The effects of low-intensity ultrasound on growing bone after sciatic neurectomy. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(3):431-7.

144. Warden SJ, Bennell KL, Matthews B, Brown DJ, McMeeken JM, Wark JD. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. *Bone*. 2001;29(5):431-6.
145. Cook SD, Salkeld SL, Mse, Patron LP, Ryaby JP, Whitecloud TS. Low-intensity pulsed ultrasound improves spinal fusion. *Spine J*. 2001;1(4):246-54.
146. Hannemann PF, Mommers EH, Schots JP, Brink PR, Poeze M. The effects of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic fields bone growth stimulation in acute fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2014;134(8):1093-106.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeitos da lesão medular na qualidade da microarquitetura, resistência mecânica e metabolismo do tecido e calo ósseo de ratos paraplégicos. Serão os agentes farmacológicos, mecânicos e físicos capazes de manter ou melhorar a qualidade desses eventos?*", registrado com o número **199/2015**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Batista Volpon** e da **Dra. Ariane Zamarioli**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de julho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 48 ratos Wistar machos pesando 220g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 01/10/2016 a 01/12/2018.

We certify that the Protocol nº 199/2015, entitled "*The effects of spinal cord injury on the bone and bone callus microarchitecture, strength and metabolism in paraplegic rats. Are drugs, mechanical loading and ultrasound therapy effective at maintaining and improving skeletal health?*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/25/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 48 male Wistar rats weighing 220g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/01/2018.

Ribeirão Preto, 25 de julho de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente da CEUA – FMRP – USP

Apêndice 1

Manuscrito

MANUSCRITO

Gene expression changes are associated with severe bone loss and deficient fracture callus formation in paraplegic rats

Mariana M. Butezloff¹, MsC; José B. Volpon², PhD; Kelly Astolpho³; João P. B. Ximenez⁴, PhD; Vitor M. Correlo⁵, PhD; Rui L. Reis⁶, PhD; Raquel B. Silva⁷, PhD; Ariane Zamarioli⁸, PhD.

¹ School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil.
ORCID: 0000-0002-0444-5053
Address: Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

² School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil.
ORCID: 0000-0002-1999-7352
Address: Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

³ School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil.
Address: Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

⁴ School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil.
ORCID: 0000-0002-6414-5220
Address: Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

⁵ 3B's Research Group – Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, University of Minho, Portugal.
ORCID: 0000-0002-5516-7583
Address: Zona Industrial da Gandra. Barco GMR, Portugal. 4805-017

⁶ 3B's Research Group – Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, University of Minho, Portugal.
ORCID: 0000-0002-4295-6129
Address: Zona Industrial da Gandra. Barco GMR, Portugal. 4805-017

⁷ School of Dentistry of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil.
ORCID: 0000-0002-0230-1347
Address: Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

⁸ School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil.
ORCID: 0000-0002-7939-0528
Address: Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

Correspondence: Ariane Zamarioli, Ribeirão Preto Medical School

Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900.

Telephone: +55 16 33153272, Fax: +55 16 33153272.

E-mail: ariane_zamarioli@hotmail.com

Funding statements

The São Paulo Research Foundation (FAPESP) funded this study.

Abstract

Spinal cord injury (SCI) leads to severe bone loss in sublesional bones, increasing the risk and incidence of low-impact fractures. The highly disrupted bone microenvironment may also impair fracture healing. We investigated the effects of SCI on bone loss and callus formation. Wistar rats were divided into two groups: (1) Sham + Fracture: non-paraplegic rats with bone fracture, and (2) SCI + Fracture: SCI rats with bone fracture. Complete transection of the spinal cord was generated at the T10 level. Ten days after SCI/Sham, the femoral diaphysis was fractured by the closed method and followed-up for 14 days. DXA, μ CT, ELISA, histomorphometry, immunohistochemistry, biomechanical test, and gene expression were used to assess calluses and non-fractured bones. SCI downregulated osteoblastic-related gene expression in the non-fractured tibias, evidencing decreased bone formation. A twofold increase in osteoclasts and the overexpression of RANK/RANKL resulted in increased bone resorption following SCI. The uncoupled bone turnover led to a reduction in bone density and impaired bone microarchitecture, resulting in weaker bones. At 14 days post-fracture, we revealed early and increased trabecular formation in the callus of SCI rats, despite a marked 75% decrease in OPG-positive cells. We detected a 41% decrease in callus density in SCI rats, which was associated with increased porosity and thinner newly formed trabeculae and lead to a 44% and 62% reduction in strength and angle failure, respectively. SCI-induced bone loss resulted from increased bone resorption and decreased bone formation. Changes in bone healing following SCI led to deficient callus formation.

Keywords: Spinal cord injury, bone healing, bone callus, bone loss.

1. Introduction

Spinal cord injury (SCI) is well known to induce severe osteoporosis in bones situated below the injury level, which leads to an increased risk of low-impact fractures (1-3). As a consequence, nearly 70% of people with SCI will fracture their bones at some point in their life after injury (2). Furthermore, hospitalization is longer for these patients, and the incidence of complications is higher (3). Considering that approximately 285,000 individuals are living with SCI in the US, with an annual incidence of nearly 54 cases/million, the social and medical impact of SCI-induced-bone loss is of great importance (4). The annual incidence of fractures in individuals with SCI ranges from 2 to 6% but may increase up to 25% in severely affected patients (5).

To maintain the integrity and capability of bone strength and elasticity, a balanced coupling should be preserved between bone formation and resorption. In our previous study, we reported an intense and rapid increase in osteoclastic activity in paraplegic rats (6), which lead to significant bone loss. Once an osteoporotic bone is fractured, its healing may be disturbed. However, the mechanism of bone healing and the quality of the healed bone following SCI are poorly understood. The topic remains very controversial as previous results have shown that callus formation in SCI individuals can be either delayed (5, 7, 8) while others have suggested it is accelerated (1, 9, 10). Further experimental studies have been conducted to better understand bone healing in SCI animals. However, the conclusions remain controversial, with some authors evidencing early and accelerated fracture (11, 12), while others showed delayed healing with poor callus formation (13, 14).

Therefore, this study was conducted to determine the impact of SCI on gene expression, levels of bone markers in serum, bone density, bone microarchitecture, bone cells activity, and the bone strength at both the non-fractured proximal tibial metaphysis and the fractured femoral diaphysis. We hypothesize that SCI severely disrupts the microenvironment of non-fractured bones and impairs bone callus formation and quality.

2. Methods

2.1 Animals and experimental groups

The Institutional Animal Care and Use Committee previously approved all animal care and experiments carried out in this study (protocol 199/2015).

Male Wistar rats weighing 200 g (± 10 g) were obtained from the central animal facility of our institution and housed in individual cages in a room with controlled conditions of humidity (55-60%), temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$),

and an artificial light/dark cycle of 12 hours. The experimental procedures were started after a three-day-interval to allow adaptation to the laboratory environment.

Thirty rats were divided into two groups ($n=15$ per group): (1) Sham + fracture: non-paraplegic rats sustaining a femur fracture; (2) SCI + fracture: rats with spinal cord injury and a femur fracture. All rats were inspected daily and weighed to monitor their general health.

2.2 Spinal cord injury and postoperative care

All rats were anesthetized by intramuscular (IM) injection of ketamine (60 mg/kg, IM) and xylazine (7.5 mg/kg, IM). Complete SCI was achieved by surgical transection of the cord at the T10 level, as previously described (6). The sham-operated animals underwent a laminectomy, with cord exposure but without transection. The animals were housed in individual cages and fed unrestrictedly with standard laboratory animal chow and water *ad libitum*. The daily postoperative care consisted of a skin examination, neurological functional assessment, and bladder expression twice a day. All rats were administered buprenorphine (0.03 mg/kg) intramuscularly twice daily for five days for postoperative pain, and 10 mL of Lactated Ringer's solution was injected subcutaneously once a day for five days to prevent dehydration. The groups were followed postoperatively for 24 days.

2.3 Closed femoral fracture

After ten days of SCI (or sham surgery) the animals were anesthetized and a femoral fracture was produced in the right diaphysis, as previously described (15). Briefly, under anesthesia, the right thigh was placed on two supports and a blunt blade attached to a lever was lowered until the bone failed. Immediately, under surgical conditions, a mini incision was made at the lateral side of the thigh, and the fracture was approached and inspected. A 1.0 mm thick surgical wire was introduced into the medullary canal, the fracture was reduced, and then, the wire was introduced into the distal segment of the femur. An X-ray was taken to check for the fracture and fixation adequacy. Any fracture not located at the bone midshaft, or excessively fragmented (three or more fragments bone), was excluded. Rats were allowed to recover postoperatively. Buprenorphine (0.03 mg/kg) was used for analgesia and injected intramuscularly for five days. The operated animals were examined daily to check for the general health, spontaneous activity, mobility, weight bearing, skin integrity, wound appearance, swollenness, and range of motion of the knee and hip. Another X-ray was taken just after the euthanasia.

2.4 Euthanasia and sample harvesting

Fourteen days post-fracture, rats were sacrificed with excessive anesthetic dosage, and samples were collected for further analysis. Non-fractured tibias were used to assess bone quality, and the fractured femurs were used to analyze bone healing. Serum samples were used to determine the activity of bone markers.

2.5 RNA isolation and real-time PCR assessment

Total RNA was extracted from the fracture callus (n=6/group) using a SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), according to the manufacturer's instruction. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with 1 µg RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's instructions. TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems) were used for quantifying collagen type 1, alpha 2 (*Col1a1*, assay ID: Rn01463848_m1), runt-related transcription factor 2 (*Runx2*, Rn01512300_m1), and osterix (*Osx*, Rn02769744_s1) expression by quantitative PCR on a StepOnePlus PCR machine (Applied Biosystems). The data were normalized to the expression of the reference gene *GAPDH* (Rn01775763_g1). Samples were run in duplicates, and relative expression was calculated using 2^{-ddCT} and the ddCt was calculated as $dCt[goi_{SCI} - ref_{SCI}] - dCt[goi_{Sham} - ref_{Sham}]$, where *goi* are the genes of interest and *ref* is the reference gene. For descriptive and statistical analyses, ddCT was applied as continuous variable. Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines were followed for designing and interpreting the results of quantitative real-time PCR (16).

2.6 Histology

Six femurs and tibias from each group were randomly selected for histological analysis. The entire fractured femurs and intact tibiae with a small quantity of adherent soft tissue were fixed in cold 4% paraformaldehyde, decalcified in cold 10% EDTA, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, and placed on charged slides (Manco Inc., USA). Coronal sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and analyzed under bright field microscopy (Axiovert; Carl Zeiss, Germany). Images were captured with a CCD camera (AxioCam MRc; Carl Zeiss, Germany) with magnifications of 50×.

2.6.1 Histomorphometry: osteoclast activity and collagen quantification

Adjacent sections were stained with Masson's trichrome, picrosirius red, and tetrad-resistant-acid phosphatase (TRAP). Picrosirius stained sections were analyzed under polarized light microscopy AxioImager Z2 (Zeiss, Germany). Masson's and TRAP-stained sections were analyzed under bright field microscopy (Axiovert; Carl Zeiss, Germany). Images were captured with a digital camera (Zeiss). Masson's trichrome staining was used to measure the trabecular area, expressed as a percentage of the total metaphyseal area (%), with a magnification of 50×. Picrosirius red staining was used to calculate the area of collagen deposition, expressed as a percentage of the total callus area (%), with a magnification of 50×. TRAP staining was used to calculate the number of osteoclasts, with a magnification of 100×. Osteoclasts were counted as TRAP-positive multinucleated cells and the total number was expressed per mm² area of trabecular bone at the tibial metaphysis. The TRAP-positive area was measured as a percentage of the entire callus area at the fractured femur (%).

2.6.2 Immunohistochemistry

The expressions of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), and the receptor activator of the nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) were calculated to assess bone metabolism. The sections were deparaffinized with xylene and rehydrated in graded ethanol. Antigen retrieval was performed by immersing the slides in citrate buffer (pH = 6.0) and heating in a microwave at 850 W. After cooling to room temperature, the slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and rinsed with 0.5% PBS/Triton solution (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, USA). Endogenous peroxidase was then blocked by immersing the slides in a 3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes under the protection of light. Immersing the slides in a 1% bovine serum albumin/PBS solution for 30 minutes blocked unspecific ligations. Then, the slides were incubated overnight at 4°C, with the following primary antibodies diluted in 1% bovine serum albumin: anti-RANK (sc-9072 rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA; 1:700), anti-RANKL (sc-7628 goat polyclonal; 1:400), anti-OPG (sc-8468 goat polyclonal; 1:700), and either rabbit or goat IgG from control section (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), depending on the primary antibody. After returning to room temperature, sections were washed and incubated in biotinylated secondary antibody (goat antirabbit and rabbit antigoat, 1:200) for 1 hour at room temperature. The sections were then washed with PBS and PBS/Triton

solution and incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Kit, Vector labs) for 30 minutes to amplify the target antigen signal. The slides were rewashed and incubated in 3,3' diaminobenzidine solution (DAB; Sigma-Aldrich Corp) with 3% hydrogen peroxide in PBS for 1 minute. Sections were counterstained with Harris' hematoxylin, washed in water, and cover-slipped. Images were captured using light microscopy, AxioImager Z2 (Zeiss, Germany) at a magnification of 100×. OPG, RANK, and RANKL positive areas were measured as a percentage of the total area.

2.7 Bone densitometry

Bone densitometry analysis was performed by Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using a Lunar DPX-IQ densitometer (Lunar; software version 4.7e, GE Healthcare, United Kingdom). A 90 mm² region of interest was used to assess the tibial proximal metaphysis. Bone mineral density (BMD, g/cm²) and bone mineral content (BMC, g) were measured. For femurs, the entire callus was selected to assess BMD, BMC, and area (region of interest, cm²). The scanning reproducibility (4%) was assessed by the root mean square coefficient of variation.

2.8 X-Ray microtomography (μ CT)

After DXA assessment, bones were scanned using a μ CT device (SkyScan 1272v2; Bruker-microCT, Belgium) at 100 kV using a 0.11-mm-thick copper filter to optimize the contrast, a 360° rotation step of 0.45°, two-frame averaging, and an isotropic resolution of 16.2 μ m. Images of each specimen were reconstructed with specific software (NRecon v.1.6.3). Bones were analyzed using CT scan software (CTAn v.1.15.4) to determine morphometric parameters in selected regions of interest (ROI). All morphometric parameters are in accordance with ASBMR nomenclature (17).

2.8.1 Trabecular microstructure assessment

The trabecular bone was assessed in the proximal metaphyseal region of the non-fractured tibias, starting immediately distal to the proximal growth plate for an extent of 3 mm. The following morphometric parameters were measured: bone volume (BV, mm³), bone volume fraction (BV/TV, %), trabecular number (Tb.N, 1/mm), trabecular thickness (Tb.Th, mm), trabecular separation (Tb.Sp, mm), density of connectivity (Conn.D, 1/mm³), tissue mineral density (TMD, g/cm³), and bone surface (BS/BV, mm).

2.8.2 Cortical microstructure assessment

The cortical bone was assessed in the diaphyseal region of non-fractured tibias, starting 8 mm distal to the proximal growth plate for an extent of 2 mm. The following morphometric parameters were measured: the cortical volume (Ct.V, mm³), cortical volume fraction (Ct.BV/TV, %), the average cortical thickness (Ct.Th, mm), and tissue mineral density (TMD, g/cm³).

2.8.3 Bone callus microstructure assessment

The entire bone callus was selected to measure the callus volume (Ca.V, mm³), the woven bone fraction, which was expressed as a percentage of the callus volume and interpreted as the callus mineralization (Ca.BV/TV, %), callus porosity (Ca.Po, %), tissue mineral density (TMD, g/mm³), density of connectivity (Conn.D, 1/mm³), and the newly formed trabecular thickness (Tb.Th, mm), separation (Tb.Sp, mm), and number (Tb.N, 1/mm).

2.9 Biomechanical test

After DXA and μ CT non-destructive assessments, the non-fractured tibias were mechanically examined by three-point-bending test and the fractured femurs were tested with torsion. A universal testing machine was used for the tibial bending test, with a 200 N load cell (EMIC, PR, Brazil). For this, the bone was placed on two metallic supports, 14.0 mm apart, and the load was vertically applied at the diaphysis, using a constant displacement rate of 2.0 mm/min. The load-deflection curve was obtained in real time, and the maximal load and stiffness were calculated (TESC software, version 13.4, Brazil). The femurs previously submitted to the fracture were placed in a custom torsion testing machine with a 2 Nm load cell (Instron 55MT) and tested in anticlockwise rotation at 0.5°/s, until failure. Using the specific software script, raw data were filtered and maximum torque, stiffness, and angular displacement at failure were measured. Bones were kept wet with saline during the test.

2.10 Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means and standard deviations (SD). The results obtained in the groups were compared using a *t*-test, where *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with RStudio 1.0.153 (RStudio, Inc., USA).

3. Results

3.1 Complications and mortality

Post-operative complications were common in SCI rats, as previously described (18). The addition of femoral fractures to these animals increased the mortality rate. Our attrition rate corresponded to 41% due to spinal cord injury (i.e., bladder rupture, autophagia, anesthetic induction, renal infection, ascites, respiratory failure, and intestinal dysfunctions) and 10% due to bone fracture intervention in paraplegic animals (i.e., anesthesia, excessive comminution of fracture, and wire loosening).

3.2 Reduction in body mass due to SCI

At the beginning of the experiment, there was no significant difference in the body mass ($p > 0.05$) between the groups (202 ± 6 vs. 211 ± 15 , $p = 0.05$). On day 10, a significant difference was observed between the non-paraplegic rats and the paraplegic rats (292 ± 20 vs. 238 ± 23 , $p < 0.05$), where the paraplegic rats failed in gaining body mass compared to the sham groups (13% vs. 45%). On day 24 post SCI, the body mass of the paraplegic rats remained lower than controls (402 ± 40 vs. 299 ± 34 , $p < 0.05$), and, as a result, so did the overall gain in body mass (42% vs. 99%).

3.3 SCI-induced severe bone loss in the non-fractured bones

3.3.1 SCI decreased the expression of osteoblastic-related genes

Compared to controls, SCI significantly downregulated the expression of osteoblastic-related genes ($p < 0.05$), impairing bone formation at several stages of osteoblast differentiation (Fig. 1).

Fig 1 SCI decreased the expression of osteoblast-related genes at several stages of osteoblast differentiation. Values were normalized to GaPDH expression. Asterisks indicate significant difference ($p<0.05$)

3.3.3 SCI increased resorption activity, thus reducing trabecular area

Histomorphometric and immunohistochemical analyses revealed an expressive and significant increase in the resorption activity in spinal cord injured rats. The TRAP staining sections (Fig. 2a) evidenced a significant twofold increase in the number of osteoclasts per trabecular area in the SCI group when compared with controls (Fig. 2b, $p<0.05$). Furthermore, the SCI group showed a significant 273% increase in the RANK-positive area and 114% in the RANKL-positive area, when compared with controls (Fig. 2c). In addition, we detected a marked 54% reduction in the trabecular area in the SCI group when compared with controls ($p<0.05$, Fig. 2d and 2e).

Fig 2 (a) Arrows indicate TRAP-positive cells and represent the number of mature osteoclasts. (b) The SCI group had twofold more TRAP-positive cells per area of trabecular bone at the proximal tibial metaphysis than controls. (c) Immunohistochemistry demonstrates a significant increase in the expression of RANK and RANKL in the SCI group, when compared with controls. (d) Histological sections stained with HE show a marked loss of trabecular bone in the SCI group. (e) The SCI rats showed a significant 54% decrease in the trabecular area when compared with controls. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$)

3.3.4 SCI significantly decreased bone density, associated with trabecular and cortical microarchitecture deterioration

There was a significant 43% decrease in bone mineral density (BMD) and a significant 70% decrease in bone mineral content (BMC) when compared to sham rats ($p < 0.05$).

The μ CT assessment evidenced that SCI resulted in the substantial loss of both trabecular and cortical bone tissue, with significant changes in several microstructural parameters. In the trabecular bone, SCI decreased BV ($p=0.08$) by 78%, BV/TV ($p=0.08$) by 73%, and increased Tb.Sp ($p<0.05$) by 83% when compared with controls. At the cortical bone, SCI significantly ($p<0.05$) decreased Ct.V by 33%, Ct.BV/TV by 17%, and TMD by 9% when compared to controls.

Table 1. Assessment of bone density at the proximal tibial metaphysis by DXA, and the analysis of bone microarchitecture at the metaphysis (trabecular bone) and tibial shaft (cortical bone) by μ CT.

	Sham	SCI
DXA		
BMD (g/cm ²)	0.07 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01 ^a
BMC (g)	0.01 $\pm$ 0.001	0.003 $\pm$ 0.001 ^a
μCT at trabecular bone		
BV (mm ³)	3.19 $\pm$ 1.90	0.70 $\pm$ 0.40 ^{a'}
BV/TV (%)	6.68 $\pm$ 4.68	1.81 $\pm$ 1.02 ^{a'}
Tb.Th (mm)	0.05 $\pm$ 0.004	0.04 $\pm$ 0.004
Tb.N (mm)	1.21 $\pm$ 0.88	0.39 $\pm$ 0.23
Tb.Sp (mm)	0.60 $\pm$ 0.34	1.10 $\pm$ 0.24 ^a
TMD (g/cm ³)	0.30 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.01
Conn.D (1/mm)	74.60 $\pm$ 76.87	23.85 $\pm$ 9.16
BS/BV (mm)	86.97 $\pm$ 3.21	94.81 $\pm$ 11.70
μCT at cortical bone		
Ct.V	7.51 $\pm$ 0.76	5.01 $\pm$ 0.53 ^a
Ct.BV/TV (%)	70.03 $\pm$ 3.32	58.39 $\pm$ 6.07 ^a
Ct.Th (mm)	0.25 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.03
TMD (g/cm ³)	0.35 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.01 ^a

^a $p<0.05$ versus Sham

^{a'} $p=0.08$ versus Sham

3.3.5 Reduction in bone strength following SCI

Our mechanical test evidenced that SCI rats exhibited significantly weaker bones compared with Sham ($p<0.05$), whence the maximal load was decreased by 55% and the stiffness by 50% (Fig. 3).

Fig 3 SCI significantly impaired the mechanical strength of non-fractured bone in comparison with Sham. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$)

3.4 Spinal cord injury changed the mechanisms of fracture healing and resulted in deficient bone callus formation

3.4.1 SCI did not decrease the expression of osteoblastic-related genes at the fracture callus

We did not detect any changes regarding osteoblastic-related gene expression at the fracture callus in SCI rats compared to non-paraplegic animals (Fig. 4).

Fig 4 SCI did not decrease the expression of osteoblast-related genes in the fracture callus. Values were normalized to GAPDH expression

3.4.2 Changes in the bone microenvironment following SCI

Our histological, histomorphometric, and immunohistochemical analysis revealed changes in callus formation between paraplegic and non-paraplegic rats.

At 14 days post-fracture, an abundant presence of cartilaginous tissue in the non-paraplegic rats was detected, but only slight cartilage formation was observed in the SCI group. In contrast, SCI rats exhibited calluses with more woven bone and trabeculae than controls. Bony bridges were undetected, and fracture gaps were observed in both groups (Fig. 5a).

We detected a significant 131% increase in collagen deposition at the callus of SCI rats when compared with controls ($p < 0.05$, Fig. 5b). No changes were observed in the TRAP-positive area calluses between the groups ($p > 0.05$, Fig. 5c).

Our immunohistochemical analysis revealed that the SCI group showed a significant 75% and 52% decrease in the OPG and RANKL-positive areas, respectively (Fig. 5d).

Fig 5 (a) HE-stained histological images of the fracture evidencing an immature callus with abundant cartilaginous tissue, woven bone, and few trabeculae in the bone callus of non-paraplegic rats (Sham). SCI rats exhibited slight cartilaginous tissue and more presence of woven bone and trabeculae than the control rats. Magnification of 25×. (b) Picrosirius-stained slides and histomorphometric analysis showed more collagen deposition in the SCI group when compared to the controls. Magnification of 50× (c) TRAP-stained slides and histomorphometric analysis revealed no changes between groups with regards to the number of osteoclasts. Magnification of 100×. (d): Immunohistochemistry evidencing a significant decrease in the expression of OPG and RANKL in the SCI group when compared with the controls. Magnification of 100×. Asterisks indicate significant difference ($p<0.05$). CB: cortical bone, Ca: cartilage tissue, WB: woven bone tissue

3.4.3 Changes in bone callus density and microstructure following SCI (Table 2)

At 14 days post bone fracture, the SCI rats exhibited bone calluses with a significant 41% and 29% decrease in BMD and in BMC ($p<0.05$), respectively, in spite of statistically similar areas ($p>0.05$).

Our μ CT assessment showed changes in bone callus microarchitecture following SCI. Although bone calluses in the SCI rats showed a 17% increase in the trabeculae number when compared with controls, they were 13% thinner and porosity was 5% higher in the paraplegic animals ($p<0.05$).

Table 2. Assessment of callus density by DXA and callus microarchitecture by μ CT.

	Sham	SCI
DXA data		
BMD (g/cm ²)	0.17 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02 ^a
BMC (g)	0.07 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01 ^a
Area (cm ²)	0.40 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07
μCT callus		
Ca.V (mm ³)	30.33 $\pm$ 7.55	25.37 $\pm$ 9.44
Ca.BV/TV (%)	22.82 $\pm$ 2.73	24.06 $\pm$ 4.79
Th (mm)	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01 ^a
N (1/mm)	2.55 $\pm$ 0.41	2.98 $\pm$ 0.30 ^a
Sp (mm)	0.25 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.05
TMD (g/cm ³)	0.06 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.05
Conn.D (1/mm ³)	285.75 $\pm$ 38.68	274.90 $\pm$ 26.04
Ca.Po (%)	76.07 $\pm$ 1.96	80.08 $\pm$ 2.43 ^a

^a $p<0.05$ versus Sham

3.4.4 Reduction in calluses strength following SCI

SCI impaired bone callus mechanical integrity (Fig. 6) by reducing the maximal torque (-44%) and ultimate angle (-62%) ($p<0.05$), resulting in calluses with lower strength and resilience (despite the increased collagen deposition).

Fig 6 SCI significantly impaired the mechanical strength of fracture calluses. Asterisks indicate significant difference ($p<0.05$)

4. Discussion

In this study, we report that spinal cord injury significantly decreases bone mass. This finding is associated with markedly reduced bone formation and increased osteoclast activity, which resulted in disruption of bone microarchitecture and strength in a rodent model of complete SCI. Furthermore, we revealed changes in bone healing following SCI, leading to a disruption in cell differentiation and maturation and resulting in deficient callus formation.

Although the pathophysiology of SCI-induced bone loss is not fully understood, we know that an injury at the spinal cord results in changes in several organs and systems, involving several pathways in the mechanism of sublesional bone loss following neurological damage. Previous clinical studies analyzed bone turnover markers in SCI individuals and concluded that bone loss in SCI was caused by increased bone resorption, with no changes in bone formation (19, 20). Our TRAP histological stained sections and immunomarkers evidenced a significant increase in the osteoclastic activity in the SCI rats, as also demonstrated by Morse et al. These authors also noted a loss of normal cellular organization at the growth plate and speculated an altered cartilage differentiation and/or signaling between cartilage and bone following SCI (21).

We additionally evidenced a significant reduction in the expression of osteoblastic-related genes at different stages of osteoblast maturation following SCI. Type I collagen is expressed at the pre-osteoblast stage. Runt-related transcription factor 2 and osterix are the two well-characterized promoters activated in early committed osteoblastic progenitors (22).

Therefore, we have shown that SCI induces a simultaneous overactivity of osteoclasts associated with decreased osteoblastic activity, thus resulting in severe bone loss following injury. Previous authors also noted similar results, where they found a highly disrupted unbalance in bone metabolism due to SCI (21, 23, 24). As a result of this uncoupled bone turnover, we observed a loss in trabecular and cortical volume with a concomitant increase in the trabecular separation rate in our tridimensional microstructural data. A previous study detected cortical thinning in the SCI population by using peripheral quantitative computed tomography (25), which is highly linked to bone weakening (26). In fact, our mechanical tests revealed a significant loss in mechanical strength following SCI.

These changes potentially increase the risk for low impact fractures in the sublesional bones in the SCI population (27-30). Statistics data suggest that 70% of SCI individuals will fracture a bone located below the injury at some point in their life (31), thus highlighting the social and medical importance of this finding. Furthermore, the profound SCI-mediated disruption of the bone microenvironment may also lead to changes during fracture healing.

Literature is controversial regarding the effects of spinal cord injury on bone healing. While some authors have shown delayed bone healing in SCI individuals (7, 28, 29, 32, 33) and animals (13), others have shown accelerated fracture healing in both clinical (1, 10, 34-36) and animal studies (11, 12, 37, 38). Therefore, we hypothesized that spinal cord injury impairs bone fracture healing, but the mechanisms and callus features remain inconclusive.

In our study, we evidenced several changes in bone healing due to spinal cord injury and fracture. The histological analysis revealed that SCI rats exhibited calluses with more trabeculae and collagen deposition than the controls. We attributed the accelerated bone formation to the mostly intramembranous ossification that occurred in SCI animals at 14 days post-fracture. In control rats, the bone healing at the same time-point occurred mainly by endochondral ossification analysis, with an abundant presence of cartilaginous tissue at the callus. Sakitani et al. (11) followed bone healing in SCI rats and also found that early bone fracture healing in paraplegic rats occurred mostly through intramembranous ossification, in contrast with the endochondral ossification displayed by the controls. Endochondral ossification involves the formation of intermediate cartilaginous tissue with subsequent remodeling into bone tissue, which requires more time. The authors showed that despite healing faster, the callus of SCI rats was weaker than the calluses of the controls. In our study we also evidenced by a

mechanical torsion test and showed lesser mechanical integrity. Furthermore, we revealed that SCI resulted in calluses with lower flexibility, despite showing more collagen deposition than the controls. We believe that SCI induced a defect in the trabecular structure quality and collagen production, which may be linked to our immunohistochemical data evidencing a marked decrease in OPG expression in paraplegic rats. Furthermore, we demonstrated by DXA that these calluses were less dense (BMD and BMC) than the controls, which was also found in the study of Ding et al. (13). We also examined the microarchitecture of the calluses by μ CT and demonstrated that although there were more trabeculae in the SCI rats, they were thinner and callus is more porous, highlighting the lesser quality of these calluses despite the early trabecular formation.

Therefore, the changes in the mechanism of bone healing in SCI rats led to the formation of calluses with more early trabeculae, despite being thinner and less dense. Although the collagen deposition has shown to be higher in the SCI rats, the lower expression of OPG in the callus may lead to disruption in the trabecula maturation and integrity, leading to weaker and less flexible callus.

In conclusion, SCI induces a severe bone loss due to both increased resorption and decreased formation. SCI also leads to changes in the mechanisms of bone healing by accelerating and increasing the presence of woven bone and trabeculae at an early stage of callus formation. The calluses in the SCI rats have a worse quality than controls, with a disruption in the bone microenvironment, lower bone density, thinner newly formed trabeculae, more callus porosity, and lower mechanical strength and flexibility.

5. Author contributions

José B. Volpon, and Ariane Zamarioli composed the research proposal, conceived and designed the experiments, discussed all of the results, and wrote the manuscript.

Mariana M. Butezloff and Kelly Astolpho performed the experiments, analyzed the findings and contributed to the manuscript preparation.

Mariana M. Butezloff, João P. B. Ximenez, Vitor M. Correlo, Rui L. Reis, Raquel B. Silva, José B. Volpon and Ariane Zamarioli analyzed the data and revised the manuscript.

Ariane Zamarioli received financial funding by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) - 2015/22126-1.

All authors revised the paper critically for intellectual content and approved the final version. All authors agree to be accountable for the work and to ensure that any questions relating to the accuracy and integrity of the paper are investigated and properly resolved.

6. Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

7. Compliance with Ethical Standards

The Institutional Animal Care and Use Committee approved all experiments and animal care carried out in this study (protocol 199/2015).

8. Funding statements

The São Paulo Research Foundation funded this study (FAPESP) - 2015/22126-1.

9. References

1. Wang L, Yao X, Xiao L, Tang X, Ding H, Zhang H, et al. The effects of spinal cord injury on bone healing in patients with femoral fractures. *J Spinal Cord Med.* 2014;37(4):414-9.
2. Szollar SM, Martin EM, Sartoris DJ, Parthemore JG, Deftos LJ. Bone mineral density and indexes of bone metabolism in spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil.* 1998;77(1):28-35.
3. Morse LR, Battaglino RA, Stolzmann KL, Hallett LD, Waddimba A, Gagnon D, et al. Osteoporotic fractures and hospitalization risk in chronic spinal cord injury. *Osteoporos Int.* 2009;20(3):385-92.
4. Schulte LM, Scully RD, Kappa JE. Management of Lower Extremity Long-bone Fractures in Spinal Cord Injury Patients. *J Am Acad Orthop Surg.* 2017;25(9):e204-e13.
5. Gifre L, Vidal J, Carrasco JL, Muxi A, Portell E, Monegal A, et al. Risk factors for the development of osteoporosis after spinal cord injury. A 12-month follow-up study. *Osteoporos Int.* 2015;26(9):2273-80.
6. Zamarioli A, Maranhão DA, Butezloff MM, Moura PA, Volpon JB, Shimano AC. Anatomic changes in the macroscopic morphology and microarchitecture of denervated long bone tissue after spinal cord injury in rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:853159.
7. Grassner L, Klein B, Maier D, Bühren V, Vogel M. Lower extremity fractures in patients with spinal cord injury Characteristics, outcome and risk factors for non-unions. *J Spinal Cord Med.* 2017;1-8.
8. Wang L, Liu L, Pan Z, Zeng Y. Serum leptin, bone mineral density and the healing of long bone fractures in men with spinal cord injury. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15(4):69-74.
9. Khallaf FG, Kehinde EO, Mostafa A. Growth factors and cytokines in patients with long bone fractures and associated spinal cord injury. *J Orthop.* 2016;13(2):69-75.
10. Ragnarsson KT, Sell GH. Lower extremity fractures after spinal cord injury: a retrospective study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1981;62(9):418-23.

11. Sakitani N, Iwasawa H, Nomura M, Miura Y, Kuroki H, Ozawa J, et al. Mechanical Stress by Spasticity Accelerates Fracture Healing After Spinal Cord Injury. *Calcif Tissue Int*. 2017;101(4):384-95.
12. Wang L, Tang X, Zhang H, Yuan J, Ding H, Wei Y. Elevated leptin expression in rat model of traumatic spinal cord injury and femoral fracture. *J Spinal Cord Med*. 2011;34(5):501-9.
13. Ding WG, Jiang SD, Zhang YH, Jiang LS, Dai LY. Bone loss and impaired fracture healing in spinal cord injured mice. *Osteoporos Int*. 2011;22(2):507-15.
14. Ding WG, Liu JB, Wei ZX. Spinal Cord Injury Causes More Damage to Fracture Healing of Later Phase than Ovariectomy in Young Mice. *Connective Tissue Research*. 2012;53(2):142-8.
15. Santiago HA, Zamarioli A, Sousa Neto MD, Volpon JB. Exposure to Secondhand Smoke Impairs Fracture Healing in Rats. *Clin Orthop Relat Res*. 2017;475(3):894-902.
16. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
17. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86.
18. Zamarioli A, Battaglini RA, Morse LR, Sudhakar S, Maranhão DA, Okubo R, et al. Standing frame and electrical stimulation therapies partially preserve bone strength in a rodent model of acute spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil*. 2013;92(5):402-10.
19. Maimoun L, Couret I, Micallef JP, Peruchon E, Mariano-Goulart D, Rossi M, et al. Use of bone biochemical markers with dual-energy X-ray absorptiometry for early determination of bone loss in persons with spinal cord injury. *Metabolism*. 2002;51(8):958-63.
20. Roberts D, Lee W, Cuneo RC, Wittmann J, Ward G, Flatman R, et al. Longitudinal study of bone turnover after acute spinal cord injury. *J Clin Endocr Metab*. 1998;83(2):415-22.
21. Morse L, Teng YD, Pham L, Newton K, Yu D, Liao WL, et al. Spinal cord injury causes rapid osteoclastic resorption and growth plate abnormalities in growing rats (SCI-induced bone loss in growing rats). *Osteoporos Int*. 2008;19(5):645-52.
22. Zhou H, Cooper MS, Seibel MJ. Endogenous Glucocorticoids and Bone. *Bone Res*. 2013;1(2):107-19.
23. Jiang SD, Jiang LS, Dai LY. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats. *Osteoporos Int*. 2007;18(3):339-49.
24. Zhao W, Li X, Peng Y, Qin Y, Pan J, Li J, et al. Sclerostin Antibody Reverses the Severe Sublesional Bone Loss in Rats After Chronic Spinal Cord Injury. *Calcif Tissue Int*. 2018.
25. Eser P, Schiessl H, Willnecker J. Bone loss and steady state after spinal cord injury: a cross-sectional study using pQCT. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2004;4(2):197-8.
26. Turner CH. Bone strength: current concepts. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068:429-46.
27. Edwards WB, Schnitzer TJ. Bone Imaging and Fracture Risk after Spinal Cord Injury. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(5):310-7.
28. Frotzler A, Cheikh-Sarraf B, Pourtehrani M, Krebs J, Lippuner K. Long-bone fractures in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2015;53(9):701-4.
29. Nottage WM. A review of long-bone fractures in patients with spinal cord injuries. *Clin Orthop Relat Res*. 1981(155):65-70.
30. Zehnder Y, Luthi M, Michel D, Knecht H, Perrelet R, Neto I, et al. Long-term changes in bone metabolism, bone mineral density, quantitative ultrasound parameters, and fracture incidence after spinal cord injury: a cross-sectional observational study in 100 paraplegic men. *Osteoporos Int*. 2004;15(3):180-9.
31. Battaglini RA, Lazzari AA, Garshick E, Morse LR. Spinal cord injury-induced osteoporosis: pathogenesis and emerging therapies. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(4):278-85.

32. Comarr AE, Hutchinson RH, Bors E. Extremity fractures of patients with spinal cord injuries. *Am J Surg*. 1962;103:732-9.
33. Ingram RR, Suman RK, Freeman PA. Lower limb fractures in the chronic spinal cord injured patient. *Paraplegia*. 1989;27(2):133-9.
34. Cipriano CA, Pill SG, Keenan MA. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg*. 2009;17(11):689-97.
35. Kurer MH, Khoker MA, Dandona P. Human osteoblast stimulation by sera from paraplegic patients with heterotopic ossification. *Paraplegia*. 1992;30(3):165-8.
36. Quinlan JF, Watson RW, Kelly G, Kelly PM, O'Byrne JM, Fitzpatrick JM. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in acute injuries of the spinal cord. *J Bone Joint Surg Br*. 2006;88(3):406-10.
37. Aro H, Eerola E, Aho AJ, Penttinen R. Healing of experimental fractures in the denervated limbs of the rat. *Clin Orthop Relat Res*. 1981(155):211-7.
38. Aro H, Eerola E, Aho AJ. Fracture healing in paraplegic rats. *Acta Orthop Scand*. 1985;56(3):228-32.