

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE**

**EFEITO DA DEXAMETASONA E DO CETOPROFENO NA
OSTEOGÊNESE E NA RESISTÊNCIA ÓSSEA EM RATOS**

PATRÍCIA COSTA DOS SANTOS DA SILVA

Alfenas – MG
2010

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE**

**EFEITO DA DEXAMETASONA E DO CETOPROFENO NA
OSTEOGÊNESE E NA RESISTÊNCIA ÓSSEA EM RATOS**

PATRÍCIA COSTA DOS SANTOS DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade José do Rosário Vellano – UNFENAS, como parte das exigências do Programa de Mestrado em Saúde para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia
CO-ORIENTADORA: Profa. Ms. Evelise Aline Soares**

Silva, Patrícia Costa dos Santos da.

Efeito da dexametasona e do cetoprofeno na osteogênese e na resistência óssea em ratos/-- Alfenas: Unifenas, 2010. 57 f.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia
Monografia (Dissertação Mestre em Saúde) -
Universidade José do Rosário Vellano.

1. Anti-inflamatórios 2. Osteogênese 3. Implantes.
II. Título

CDU: 615.828(043.3)

Folha de Aprovação

Patrícia Costa dos Santos da Silva

EFEITO DA DEXAMETASONA E DO CETOPROFENO NA OSTEOGÊNESE E NA RESISTÊNCIA ÓSSEA EM RATOS

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE

Alfenas, 16 de Abril de 2010

Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia – Orientador – UNIFENAS

Profª Ms. Evelise Aline Soares – Co-orientadora – UNIFENAS

Profª Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa – UNIFENAS

Profª Dra. Walnéia Aparecida de Souza - UNIFAL

DEDICATÓRIA

A DEUS

“O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação, e o meu alto refúgio.” (Salmo 18.2)

Aos meus pais, Aparecido e Maria Estela.

“...Se um dia, já homem feito e respeitado, sentires que a terra cede aos teus pés, que tuas obras se desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbúcia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: Meu pai, minha mãe...” (Rui Barbosa).

Obrigada pelas oportunidades, amizade, amor incondicional e presença em cada momento de minha vida. Amo vocês.

Ao meu esposo, Luiz Roberto, grande companheiro, que, na sua forma peculiar de ser, sempre esteve presente, com seu carinho, apoio, incentivo, amizade e amor, fundamentais em minha vida.

Ao meu filho, Raphael, pela presença, compreensão e carinho ...

Aos meus irmãos e familiares que compartilharam comigo desse sonho...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço e louvo a DEUS, pela graça que me foi concedida de concluir mais uma jornada, e por ser a Fonte de Inspiração de todo o conhecimento.

Ao Magnífico Reitor da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Professor EDSON ANTÔNIO VELANO (in memoriam) e à Reitora Professora MARIA DO ROSÁRIO ARAÚJO VELANO, pela oportunidade profissional.

Ao Professor Dr. JOSÉ ANTONIO DIAS GARCIA, meu orientador, que me conduziu com conhecimento científico, amizade e comprometimento durante a pesquisa.

A Professora EVELISE ALINE SOARES, minha co-orientadora, pelo apoio irrestrito na execução da parte experimental, contribuindo de forma significativa para a conclusão deste trabalho.

A Coordenadora Profa. Dra. ANA MARIA DUARTE DIAS COSTA, pela oportunidade de me tornar mestre.

Ao Professor MÁRIO SÉRGIO OLIVEIRA SWERTS, Supervisor de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFENAS, pelas orientações e motivações para que o estudo se viabilizasse.

Ao meu esposo, LUÍZ ROBERTO DA SILVA, que sempre esteve comigo, mesmo quando eu estava ausente.

Ao meu filho RAPHAEL COSTA DOS SANTOS DA SILVA, pelo incentivo, carinho e apoio nas horas difíceis.

A Coordenadora Profa. CLAUDIA UMBELINA BAPTISTA ANDRADE, que viabilizou condições para a plena realização das disciplinas do mestrado.

Aos meus irmãos, TIAGO E ODIRLEI, pelo apoio e compreensão durante meus estudos.

A meus sogros, Sr. LUÍZ MÁRIO e D. IVANIR, pelo carinho, apoio e amizade.

Ao técnico do laboratório de histologia da UNIFENAS, Antônio Marcos Santos, que com muita atenção e carinho me auxiliou na realização dos cortes histológicos de meu estudo.

Aos COLEGAS DE MESTRADO, pela presença amigável e descontraída em todos os instantes.

Ao Professor VINÍCIUS VIEIRA VIGNOLI, Supervisor de Textos da UNIFENAS, pelo auxílio na supervisão deste trabalho.

Aos meus amigos que, de alguma maneira, estiveram presentes nesta etapa. A todos vocês, muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Punch trepano[®] de 3mm 32
- Figura 2. Módulo de flexão MTS (modelo TESTSTAR II) (A); teste de flexão do fêmur em 3 pontos a uma velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) com célula de carga de 100 Kgf (B). 35
- Figura 3. Fotomicrografia transversal do sítio de implantação da HAD na epífise proximal da tibia mostrando menor volume de osso neoformado (*) nos animais dos grupos AINES e AIES quando comparados com o grupo CT. (HE, 400X). 37
- Figura 4. Fotomicrografia frontal do osso parietal exibindo menor neoformação na falha óssea dos animais dos grupos AINES e AIES em comparação com os do grupo CT. (HE 40X). 38
- Figura 5. Fotomicrografia frontal do osso parietal exibindo menor neoformação na falha óssea dos animais dos grupos AINES e AIES em comparação com os do grupo CT (painel superior HE 40X e painel inferior HE 400x). 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comparação do consumo diário da dieta líquida (água), da dieta sólida (ração) e do ganho de peso (ΔP) ao longo do experimento.	36
Tabela 2.	Volume de osso neoformado ao redor da HAD implantado na tibia esquerda e neoformação na falha óssea do parietal.	40
Tabela 3.	Propriedade estrutural (força máxima) registrada pelo módulo de flexão MTS (modelo TESTSTAR II) no ensaio mecânico dos animais dos grupos CT, AINES e AIES.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔP	Ganho de peso
%	por cento
°C	grau celsius
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AIES	anti-inflamatório esteroidal
AINES	anti-inflamatório não esteroidal
BMP-1	proteína morfogenética do osso 1
BMP-2	proteína morfogenética do osso 2
BMP-4	proteína morfogenética do osso 4
BMP-7	proteína morfogenética do osso 7
BMPs	proteínas morfogenéticas do osso
Cbfa-1	<i>core binding factor alpha 1</i> = fator alfa do núcleo de ligação 1
cm	centímetro
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase -2
CT	controle
EPM	erro padrão da média
FGF	fator de crescimento fibroblástico
g	grama
GH	hormônio do crescimento
h	hora
H+	íons prótons
HAD	hidroxiapatita densa
HE	hematoxilina eosina
IGF-I	fator de crescimento insulino símile-1
IL	interleucina
IM	intramuscular

Kg	kilograma
Kgf	kilograma força
L	litro
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
N	Newton
OPGL	osteoprotegerina ligante
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PGE2	prostaglandina E2
PTH	paratormônio
RANK	receptor ativador do fator de necrose tumoral
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
TGF	fator de crescimento transformante
UNIFENAS	Universidade José do Rosário Vellano
X	vezes

RESUMO

SILVA, Patrícia Costa dos Santos. Efeito da dexametasona e do cetoprofeno na osteogênese e na resistência óssea em ratos. Orientador: José Antonio Dias Garcia. Alfenas: UNIFENAS, 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde).

O tratamento de diversas afecções do sistema musculoesquelético com anti-inflamatórios é muito freqüente. Entretanto, os efeitos da utilização dessas drogas na neoformação óssea e osseointegração após fraturas ou cirurgias ósseas permanecem pouco esclarecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do cetoprofeno (AINES) e da dexametasona (AIES) na osteogênese ao redor de implante de hidroxiapatita densa (HAD) na tíbia esquerda, no osso parietal esquerdo, e na resistência óssea do fêmur. Utilizaram-se 15 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando em média 250 ± 30 g, com 50 dias de idade. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=5): controle (CT), anti-inflamatório não esteroideal (AINES) e anti-inflamatório esteroideal (AIES). Após a anestesia com quetamina/xilazina IM, foi produzido no osso parietal esquerdo e na epífise proximal da tíbia esquerda uma cavidade de 3 mm. Na cavidade da tíbia foi implantada a biocerâmica hidroxiapatita densa. O perióstio e a pele foram reposicionados através da sutura de suas bordas. Os animais do grupo AINES foram submetidos ao tratamento com cetoprofeno na dose de 12 mg/Kg/dia, e os do grupo AIES receberam doses de 0,10 mg/kg/dia de dexametasona por via subcutânea durante 30 dias. Os animais do grupo CT receberam solução salina pela mesma via de administração. Todos os animais receberam a mesma dieta sólida e água *ad libitum*. Foram calculados os consumos diários de água e ração para avaliar o estado nutricional dos animais. Após 30 dias de experimento os animais sofreram eutanásia, os fêmures coletados, para teste mecânico, e os locais do implante das tíbias e o osso parietal, para análise histomorfométrica. O consumo diário de água e de ração foi satisfatório entre os grupos, mostrando não haver desnutrição protéica e desidratação. Microscopicamente observamos menor volume de osso neoformado nos animais dos grupos AINES e AIES. Além disso, os animais dos grupos AINES e AIES necessitam de menor força máxima para a ruptura completa dos fêmures quando comparados com o grupo CT. Concluímos que o cetoprofeno e a dexametasona interferiram na osteogênese e ao redor do implante de HAD e no osso parietal, e diminuiu a resistência óssea por alterar o metabolismo do tecido ósseo, principalmente pela inibição da COX2 e diminuição das prostaglandinas. Assim, o uso do cetoprofeno e da dexametasona pós-cirurgias ósseas pode comprometer a estabilidade e manutenção do implante.

Palavras-chave: Anti-inflamatórios. Osteogênese. Implantes.

ABSTRACT

SILVA, Patrícia Costa dos Santos. Effect of dexamethasone and ketoprofen on osteogenesis and bone resistance in rats. Adviser: José Antonio Dias Garcia. Alfenas: UNIFENAS, 2010. Dissertation (Máster's degree in Health Care)

The treatment of several affections of the musculoskeletal system with anti-inflammatory drugs is very frequent. However, the effects of such drugs on bone neoformation and osseointegration after fractures or bone surgeries are not well understood yet. This study aimed at evaluating the effect of ketoprofen (NSAID) and dexamethasone (SAID) on osteogenesis around a dense hydroxiapatite (DHA) implant in the left tibia and left parietal bone, and on the femur bone resistance. Fifteen fifty-day-old Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing on average 250 ± 30 g were used. The animals were separated into three groups (n=5): control (CT); non-steroidal anti-inflammatory (NSAID); and steroidal anti-inflammatory (SAID). After anesthesia with IM ketamine/xylazine, a 3 mm cavity was made in the left parietal bone and in the proximal epiphysis of the left tibia. A DHA bioceramic was implanted in the tibia. The periosteum and the skin were repositioned by suturing their borders. The animals were treated subcutaneously during 30 days as follows: NSAID group: ketoprofen at the dose of 12/Kg/day; SAID group: dexamethasone, 0,10 mg/kg/day. The CT group received saline through the same route. All the animals received the same solid diet and water *ad libitum*. The daily water and ration consumption were calculated to evaluate the animals' nutritional conditions. After 30 days of experiment, the animals were euthanized, and their femurs collected for the mechanical test, while their tibia and parietal sites were prepared for the histomorphometrical analysis. The daily consumption of water and ration was satisfactory, showing neither dehydration nor protein undernourishment. Microscopically, the SAID and NSAID groups showed a lower volume of neoformed bone. In addition, the NSAID and SAID group femurs required lower maximum force for complete rupture when compared with the CT group. It was concluded that ketoprofen and dexamethasone interfered with osteogenesis and decreased bone resistance by altering the bone tissue metabolism, mainly by inhibiting the COX-2 and decreasing prostaglandins. Therefore, the use of ketoprofen and dexamethasone after bone surgeries can compromise the stability and maintenance of implants.

Keywords: Anti-inflammatory drugs. Osteogenesis. Implants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 TECIDO ÓSSEO.....	15
2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	17
2.3 REPARO ÓSSEO E IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA.....	20
2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS	24
2.4.1 Efeitos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) no tecido ósseo	24
2.4.2 Efeitos dos anti-inflamatórios esteroidais (AIES) no tecido ósseo.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 PROTOCOLO ANIMAL.....	31
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	32
3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO	33
3.4 TESTE MECÂNICO	34
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 AINES E AIES NÃO ALTERARAM O GANHO DE PESO DOS ANIMAIS.....	36
4.2 AINES E AIES DIMINUÍRAM O VOLUME DE OSSO NEOFORMADO AO REDOR DA HAD NA TÍBIA.....	36
4.3 AINES E AIES DIMINUÍRAM O VOLUME DE OSSO NEOFORMADO NA FALHA ÓSSEA DO OSSO PARIETAL	37
4.4 AINES E AIES DIMINUÍRAM A PROPRIEDADE ESTRUTURAL DO FÊMUR..	40
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÃO.....	48
7 REFERÊNCIAS	49
8 ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas rígidas e representam os principais elementos de sustentação do corpo. Trata-se de um tecido mineralizado que exhibe, além de suas propriedades mecânicas, capacidade de regeneração espontânea. Assim, os defeitos ósseos podem ser reparados pela produção de tecido novo com a mesma organização estrutural do tecido original. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada, de modo que o reparo de lesões com grande perda de massa óssea provocadas por traumas, infecções ou ressecções de neoplasias representa um desafio para as cirurgias reconstrutivas nas áreas médica e odontológica.

O processo de regeneração óssea depende de fatores biomecânicos e biológicos, e a atuação dos fatores de crescimento locais e sistêmicos nas diferentes fases da regeneração (inflamação, reparo e remodelação) é essencial para a formação de novas células imediatamente após a lesão, potencializando a formação do tecido ósseo.

O processo inflamatório representa um dos mecanismos de defesa do organismo humano, sendo fundamental no reparo tecidual. A inflamação pode ser definida como uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor, caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e de sangue para o interstício. Mesmo sendo um processo fisiológico da cicatrização, a inflamação aguda pode tornar-se desconfortável para o paciente devido ao edema e à dor local.

Visando a minimizar estes efeitos da fase inflamatória da cicatrização, são utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e esteroidais (AIES) no tratamento de diversas afecções do sistema musculoesquelético. Trata-se de uma

prática comum e eficaz, minimizando a formação de processos inflamatórios, reduzindo o edema e o processo doloroso. No entanto, os efeitos da utilização dessas drogas na neoformação óssea e osseointegração após fraturas ou cirurgias permanecem pouco esclarecidos.

OBJETIVO

Verificar os efeitos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e esteroidais (AIES) sobre a osteogênese e a propriedade estrutural (força máxima) do osso em ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido altamente especializado e participa na homeostasia mineral do organismo humano, contribuindo de maneira relevante na manutenção do cálcio sérico. Constitui-se basicamente de uma matriz orgânica, mineral inorgânico, células e água. No indivíduo normal o esqueleto corresponde a aproximadamente 15% do peso corporal total, e cerca de 65 a 70% dele é constituído pelo componente mineral ósseo e 30 a 35% de material orgânico – a matriz. A fase mineral sólida é responsável por duas funções principais: atua como reservatório iônico e como excelente estrutura que determina, em grande parte, as propriedades mecânicas do tecido ósseo e do osso como um órgão (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A matriz orgânica do osso contém 90-95% de fibras de colágeno e 5-10% de substância fundamental. O colágeno é o principal componente protéico do osso e a maior parte dele é do tipo I, sendo rico nos aminoácidos glicina, lisina e prolina. A molécula do colágeno tem estrutura helicoidal, composta por três cadeias polipeptídicas, unidas por ligações covalentes e não covalentes. As moléculas de colágeno ligadas em paralelo formam fibrilas, que reagrupadas na matriz extracelular, formam as fibras. Estas fibras, constituindo uma estrutura lamelar, estão estendidas principalmente ao longo das linhas de força tensional do osso (ZANABONI *et al.*, 2000). O restante da matriz orgânica é composto por outras proteínas não colágenas, cujo papel não está bem esclarecido. As mais abundantes são a osteonectina, a osteocalcina, a osteopontina e a sialoproteína óssea (KESSEL, 2001).

Os componentes inorgânicos da matriz óssea são principalmente o cálcio e o fósforo, que estão organizados como uma estrutura de cristal, a hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ –, que constitui cerca de 50% do peso total da matriz óssea. A deposição de hidroxiapatita se faz ao longo das fibras de colágeno em sítios especiais. Outros íons como o sódio, potássio, flúor, estrôncio, magnésio, citrato e o carbonato, também estão presentes, em menores proporções, nos cristais de hidroxiapatita. A associação de hidroxiapatita com fibras do colágeno é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O cálcio é o principal mineral do esqueleto humano e um nutriente essencial na dieta de indivíduos adultos e de crianças. Cerca de 99% do cálcio corpóreo se encontra no esqueleto, principalmente sob a forma de hidroxiapatita. Desempenha inúmeras funções fundamentais no organismo tais como: contração das células cardíacas, adequação do tônus vascular, transmissão de impulsos nervosos, liberação de secreções endócrinas e exócrinas, ativação de fatores da coagulação e como cofator de reações enzimáticas (RANG, DALE e RITTER, 2004).

A homeostasia do cálcio é mantida por vários sistemas hormonais que atuam, basicamente, no intestino, rim e osso. A absorção de cálcio no intestino envolve uma proteína de ligação do cálcio, cuja síntese é regulada pelo calcitriol. O conteúdo global de cálcio do organismo provavelmente é regulado, em grande parte, por esse mecanismo de absorção, visto que, normalmente, a excreção urinária de cálcio permanece mais ou menos constante. Em condições onde ocorre uma elevação na concentração sanguínea de cálcio, a excreção urinária aumenta, ao passo que, com concentrações sanguíneas baixas, a excreção urinária pode ser reduzida pelo

paratormônio e pelo calcitriol, que aumentam a reabsorção de cálcio nos túbulos renais (RANG, DALE e RITTER, 2004).

Os mecanismos normais de regulação do cálcio têm como objetivo a manutenção dos seus níveis plasmáticos dentro da estreita faixa de normalidade. Esses mecanismos dependem da absorção intestinal e renal de cálcio, e de sua deposição ou liberação do osso. Assim sendo, o fluxo de cálcio no organismo é regulado pelo paratormônio, Vitamina D3 e calcitonina (RANG, DALE e RITTER, 2004).

Uma característica que distingue o tecido ósseo é a mineralização da matriz, que produz um tecido extremamente duro, capaz de desempenhar funções de sustentação e proteção, sendo basicamente uma forma especializada de tecido conjuntivo que é constituído por células e matriz extracelular . Os constituintes celulares do tecido ósseo são: (1) célula osteoprogenitora, considerada uma célula em repouso que pode ser estimulada para transformar-se em osteoblasto; (2) osteoblasto, célula diferenciada e responsável pela produção de matriz óssea e também associada à calcificação da matriz; (3) osteócito, célula óssea madura que está englobada pela matriz e (4) osteoclasto, célula com função de reabsorção óssea. Por sua vez, todo o tecido ósseo é revestido externamente pelo periósteo, membrana de tecido conjuntivo denso, e internamente pelo endósteo, que possui células de formação e reabsorção óssea (TORTORA e GRAMBOWSKI, 2006; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo é extremamente ativo. No esqueleto em desenvolvimento , essa atividade é primariamente voltada para o crescimento e a modelação óssea, processos

pelos quais o osso atinge sua forma e seu tamanho. No adulto a atividade metabólica predominante envolve a remodelação (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

A remodelação óssea é definida como um processo de aposição no qual ocorre remoção local do osso antigo (reabsorção) e substituição por osso recentemente formado (KAWAMOTO e NAGAOKA, 2000).

Somente 5 a 20% da superfície óssea sofrem remodelamento num determinado momento; o restante permanece em repouso, ou seja, na fase quiescente. O processo de remodelamento demora de 3 a 4 meses, começa pela ativação dos osteoclastos e finaliza-se com formação do novo osso pelos osteoblastos. Em uma pessoa saudável, de 4 a 10 % de substância óssea são substituídas anualmente (SIMÕES *et al.*, 1995).

O processo de remodelação óssea inicia com o recrutamento das células precursoras de osteoclastos, presentes em tecidos hematopoéticos, como na medula óssea. A absorção da matriz extracelular óssea, pelos osteoclastos, e a produção de nova matriz óssea, pelos osteoblastos, ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas (BMU). A diferenciação das células precursoras do osteoclasto, assim como a sua ativação, é estimulada pelo calcitriol, paratormônio e pela interceulina-6. O osteoblasto também é estimulado por essas substâncias, expressando um ligante de superfície, o ligante de osteoprotegerina (OPGL). Este ligante interage com um receptor presente na superfície dos osteoclastos, denominado RANK (receptor ativador de fator de necrose tumoral); os osteoblastos produzem o fator estimulante de colônias para macrófagos (M-CSF), induzindo a diferenciação e ativação dos osteoclastos. Ocorre fusão dos osteoclastos, produzindo células gigantes multinucleadas de reabsorção óssea (RANG, DALE e RITTER, 2004).

O próximo estágio consiste no reconhecimento das proteínas de matriz óssea extracelular por meio de proteínas de membrana celular chamadas integrinas (DUONG e RODAN, 2001).

Na fase de reabsorção, os osteoclastos ativados degradam tanto componentes minerais quanto os orgânicos, pela secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e de colágeno (BANDEIRA, 2000). As prostaglandinas, principalmente a PGE₂, que é produzida pelos osteoblastos, participa da ativação dos osteoclastos, juntamente com o calcitriol, paratormônio (PTH), fator de necrose tumoral (TNF), além das interleucinas 1, 11 e 6 (BANDEIRA, 2000).

Os osteoclastos deslocam-se ao longo do osso, escavando-o através da secreção de H⁺ e enzimas proteolíticas. Esse processo libera gradualmente fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante-beta (TGF-beta), fator de crescimento insulino símile-1 (IGF-I), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (MUNDY, 1999; RANG, DALE e RITTER, 2004). Por sua vez, esses fatores recrutam e ativam grupos sucessivos de osteoblastos, cujo desenvolvimento a partir de células precursoras foi estimulado, e que estão esperando um sinal para iniciarem sua atividade. Após ativados, os osteoblastos, invadem o local, sintetizando e secretando a matriz orgânica do osso, osteóide, e secretando IGF-1 e TGF – beta (que ficam retidos no osteóide). À medida que os osteoblastos secretam osteóide, ficam presos, formando os osteócitos terminais; outros interagem com precursores dos osteoclastos e os ativam, reiniciando, assim, o ciclo (RANG, DALE e RITTER, 2004). A síntese osteoblástica prolonga-se por vários dias, tempo suficiente para que o colágeno forme suas pontes de ligação. A deposição mineral inicia-se subsequentemente, permanecendo poucos osteoblastos retidos à

matriz em mineralização, transformando-se em osteócitos, enquanto a maioria sofre apoptose (BANDEIRA, 2000). O término da atividade dos osteoblastos pode ser devido à inibição por *feedback* negativo ou à indução da apoptose do osteoblasto pelo TNF liberado pelas células medulares vizinhas (HILL e ORTH, 1998).

2.3 REPARO ÓSSEO E IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA

Além das excelentes propriedades mecânicas, o tecido ósseo apresenta um potencial único para reparação, sendo capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio de regeneração, formando um novo tecido com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatriz (SCHENK, 1994). Após uma lesão no tecido ósseo, uma sequência de eventos dinâmicos ocorre com a finalidade de restaurar a forma e a função do osso. A reparação óssea é semelhante tanto para pequenas quanto para grandes injúrias, para fraturas ósseas e para defeitos cirúrgicos. Nos locais de fratura óssea, ocorre sangramento local, pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. É formado um hematoma ou coágulo sanguíneo dentro do canal medular, entre as extremidades da fratura óssea e o perióstio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O coágulo que surge após a fratura consiste em extravasamento de hemácias, fibrina, plaquetas, que liberam PDGF, FGF e TGF- alfa, fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular (HOLLINGER e WONG, 1996).

Para que o reparo se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos. Simultaneamente à formação do coágulo, o tecido circunvizinho à fratura se necrosa. Esse tecido necrótico estimula

intensa resposta inflamatória, caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, células mesenquimais e leucócitos (MOURAD, 1997).

Aproximadamente do terceiro ao quinto dia após a fratura, o perióstio e o endóstio próximos à área fraturada respondem com intensa proliferação, um tecido muito rico em células osteogênicas é formado, constituindo um colar em torno da fratura, que penetra entre as extremidades ósseas rompidas, sendo denominado calo fibroso. Células endoteliais derivadas de tecidos adjacentes migram, proliferam-se e formam novos capilares que penetram no hematoma. A hipóxia local parece ser o estímulo para essa nova formação vascular. A angiogênese ocorre em direção a um gradiente químico, que pode ser estabelecido pela concentração de quimiotáticos, como o PDGF, FGF e a hipóxia local (HOLLINGER e WONG, 1996; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Osteoblastos localizados no interior do calo sintetizam colágeno e matriz; portanto, nesse anel ou colar conjuntivo, bem como no conjuntivo localizado entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que se formam, como também por ossificação intramembranosa. Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo, o qual é constituído de tecido ósseo imaturo, que se formou de modo desorganizado, caracterizado por arranjo irregular dos osteócitos e orientação irregular das fibras colágenas (TROWBRIDGE e EMLING, 1996; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Enquanto o processo de reparação continua, ocorre remodelação óssea, o calo se torna desnecessário, ocorrendo desta forma sua reabsorção, e as trabéculas ósseas são formadas e orientadas ao longo de linhas de esforços e se tornam funcionais. A

velocidade desse processo depende de alguns fatores locais e sistêmicos, entre eles presença de processo infeccioso, sangramentos, tipo de tecido ósseo a ser reparado (cortical ou esponjoso), imobilização local, idade, alterações nutricionais e uso de medicamentos (MOURAD, 1997; TROWBRIDGE e EMLING, 1996; RANG, DALE e RITTER, 2004).

As pressões e trações exercidas sobre o osso durante o reparo da fratura óssea, e após o retorno às atividades normais, causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo maturo. Se essas pressões e trações forem iguais às exercidas sobre o osso antes da fratura, a estrutura do osso volta a ser a mesma que existia anteriormente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Em regiões que apresentam excessiva mobilidade, pode ocorrer o desenvolvimento de cartilagem, tecido que possui menos exigências metabólicas do que o osso. Quando o tecido é imobilizado, a reparação ocorre por meio de formação óssea primária (HOLLINGER e WONG, 1996).

As células ósseas não atuam de forma isolada durante esse processo dinâmico. Elas são reguladas por interações sistêmicas, executadas pelo sistema endócrino, por meio da liberação de diversos hormônios: PTH, GH, insulina, calcitonina, hormônios esteróides e da tireóide (HOLLINGR e WONG, 1996).

Apesar de apresentar excelentes propriedades mecânicas, esta capacidade regenerativa é limitada, de modo que o reparo de lesões com grande perda de massa óssea provocadas por traumas, infecções ou ressecções de neoplasias representa um desafio para as cirurgias médicas e odontológicas (SAKAKURA, MARCANTONIO e REZENDE, 2001). Assim, os implantes autógenos e de biomateriais visam a manter as

mesmas características físicas, químicas e mecânicas do tecido ósseo quando colocados na área receptora (BERTRAN *et al.*, 2000).

Os materiais autógenos para a realização de enxertos ósseos vêm sendo a primeira escolha, pois, são fontes de células osteogênicas, osteocondutores e não promovem reações de imunogenicidade. Apesar das vantagens oferecidas por esses enxertos, o procedimento para a sua obtenção acarreta tempo operatório maior, dobra os locais cirúrgicos e nem sempre oferece quantidade de osso suficiente para o reparo (HILL e HORNE, 1999).

Devido às limitações para obtenção do material autógeno, surgiram os implantes de biomateriais. Dentre esses implantes destaca a hidroxiapatita sintética, que é uma biocerâmica com composição química similar ao osso. Quando implantada, apresenta estabilidade química e biocompatibilidade (ONO, TATESHITA e NAKAJIMA, 2000; LEGEROS, 2002), sendo amplamente utilizada na correção de defeitos ósseos em várias espécies (ARAKAKI *et al.*, 1995).

A hidroxiapatita é o principal componente mineral dos tecidos mineralizados do corpo humano e apresenta a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (CAMILLI *et al.*, 2004). Para o uso clínico a hidroxiapatita pode ser produzida em pó ou blocos densos ou porosos, com diferentes granulações e associada a diversos materiais, como o colágeno, matriz óssea desmineralizada e proteínas osteoindutoras (VIDIGAL JÚNIOR e GOISMAN, 2003).

Existem vários fatores que podem interferir no processo de osteogênese ao redor do implante, dificultando a migração, proliferação e diferenciação das células osteogênicas e a síntese de colágeno, comprometendo a osteointegração (SOARES *et al.*, 2010). Esses fatores podem ser divididos em mecânicos e biológicos. Entre os

fatores mecânicos encontramos a intensidade do trauma e a inadequada estabilização da fratura (KUMAR, JAFFIN e BERMAN, 2002; SOARES *et al.*, 2010) e entre os fatores biológicos encontramos as doenças metabólicas, as doenças carenciais e o uso de medicamentos.

2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS

O processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à lesão celular, sendo caracterizado como um fenômeno complexo, dinâmico, podendo manifestar-se mediante qualquer agente lesivo, como traumas, cirurgias, queimaduras, microrganismos, substâncias cáusticas. A resposta inflamatória aguda envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, consistindo fundamentalmente em uma reação inata, não imunológica, com eventos vasculares e celulares e uma resposta imune adquirida (SILVA, 2006).

Com a perspectiva de minimizar os sinais e sintomas do processo inflamatório, os anti-inflamatórios têm sido amplamente utilizados pelos profissionais de saúde, principalmente em traumas ortopédicos acidentais ou provocados cirurgicamente (PELISSONI *et al.*, 2003).

Os possíveis efeitos deletérios dessas drogas sobre o reparo ósseo, no entanto, têm sido objeto de muita investigação, com resultados ainda controversos (CURVÊLLO, 2004).

2.4.1 Efeitos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) no tecido ósseo

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são os medicamentos de maior prescrição em todo o mundo, tanto para os animais como para os seres humanos.

Combatem a inflamação, a dor, a hipertermia, podendo também inibir a agregação plaquetária. Atuam inibindo a ação das ciclooxigenases (COXs) diminuindo assim a produção de prostaglandinas (SILVA, 2004; RANG, DALE e RITTER, 2004).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) possuem três principais efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético. Esses efeitos estão relacionados com a ação primária destas drogas, que consiste na inibição da enzima araquidonato ciclooxigenase (COX) e, portanto, inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos (RANG, DALE e RITTER, 2004). Existem dois tipos de Cox: a COX-1 e a COX-2. A COX-1, enzima presente nas plaquetas sangüíneas, envolvida na sinalização celular e na homeostase tecidual; a COX-2, presente nas células inflamatórias ativadas e que produz mediadores da inflamação (MEADLE, SMITH e WINTT, 1993).

O cetoprofeno é derivado do ácido arilcarboxílico, pertencente ao grupo do ácido propiônico, das drogas antiinflamatórias não esteroidais. Possui atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética (TASAKA, 2002).

É um inibidor de dupla ação, pois inibe COX-1 e 2, atuando tanto sobre a ciclooxigenase quanto sobre a lipoxigenase, levando ao bloqueio das respostas inflamatórias vasculares e celulares (TASAKA, 2002).

Os fármacos derivados do ácido propiônico são destinados ao tratamento da artrite reumatóide, osteoartrite, bursites, sinovites, tenossinovites, epicondilites, tendinites e processos inflamatórios odontológicos (SILVA, 2006).

O cetoprofeno é metabolizado por dois principais processos: uma menor parte, por hidroxilação, e a maior parte, por conjugação com o ácido glicurônico, envolvendo a enzima citocromo P-450. Possui ação analgésica de longa duração, devendo ser administrado de 24 em 24 horas, por ser potente inibidor da síntese de prostaglandinas,

prostaciclina; existe risco de toxicidade renal e gastrointestinal (GRISNEAUX *et al.*, 1999).

Akman *et al.* (2002) observaram redução na formação óssea em fraturas de tíbia em ratos após administração de diclofenaco (2 mg/Kg via subcutânea) por 10 dias. Camilotti *et al.* (2005) analisaram periodontites induzidas por ligaduras em ratos e não constataram perda óssea alveolar nos animais tratados com cetoprofeno (12 mg/kg via subcutânea) por 31 dias. Pelissoni *et al.* (2003) constataram que o cetoprofeno (2 mg/kg via subcutânea) por 6 dias pós-osteotomias em ulnas de coelho não interferiu no processo de formação do calo ósseo. Martins *et al.* (2005) observaram que o cetoprofeno influenciou no processo de reparação óssea, devido a um aumento na densidade óptica realizada em tíbias fraturadas de ratos durante a primeira semana pós-fratura e atraso na neoformação óssea após três semanas.

Embora também seja um inibidor da ciclooxigenase, o cetoprofeno parece estabilizar as membranas lisossômicas e pode antagonizar as ações da bradicinina (INSEL, 1996). Os efeitos analgésicos do cetoprofeno já foram testados em vários experimentos (NIEMI *et al.*, 1995; MATSUDA *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001); contudo, os mecanismos precisos do efeito deste anti-inflamatório na osteogênese ainda permanecem obscuros.

Lamano-Carvalho (2007) menciona que a literatura mostra que a maioria dos trabalhos sobre os AINES convencionais podem atrasar o reparo de fratura de ossos longos e a fusão espinhal, em animais de laboratório, e interferir negativamente com a taxa de fusão espinhal, em humanos. Mesmo com a comprovação da importância da prostaglandina E2, sintetizada por osteoblastos sob estímulo da COX-2, para a formação óssea, os resultados experimentais relacionados aos prováveis efeitos

inibitórios dos AINES seletivos sobre o reparo ósseo, além de raros, são ainda controversos, e não há comprovação de que eles interferem na neoformação óssea reparacional em humanos.

2.4.2 Efeitos dos anti-inflamatórios esteroidais (AIES) no tecido ósseo

Os glicocorticóides são drogas usadas de forma ampla em função de seus efeitos imunossupressivos e anti-inflamatórios no tratamento de muitas doenças reumáticas, além de outras doenças inflamatórias. Porém, seu uso é muitas vezes limitado pelas numerosas reações adversas que provoca (ANTI, GIORGI e CHAHADE, 2008).

Os corticosteróides são hormônios secretados pelo córtex das glândulas suprenais. Os glicocorticóides são produzidos pela zona fasciculada, estão envolvidos em diversas funções fisiológicas e também na adaptação a situações de estresse (ANTI, GIORGI e CHAHADE, 2008). Os glicocorticóides podem ser classificados de acordo com sua meia-vida, sua potência e sua duração de ação. A caracterização de duração de ação, como curta, intermediária e longa, é baseada na duração da supressão do ACTH após dose única, com atividade anti-inflamatória equivalente a 50 mg de prednisona. São considerados glicocorticóides de ação curta a cortisona e a hidrocortisona, pois suprimem o ACTH por 8 a 12 horas; glicocorticóides de ação intermediária são a prednisona, a prednisolona, a metilprednisolona e a triamcinolona; estas suprimem o ACTH por 12 a 36 horas. Os glicocorticóides de ação longa, que são a dexametasona e a betametasona, promovem supressão do ACTH por 36 a 72 horas (ANTI, GIORGI e CHAHADE, 2008).

A dexametasona sintética é 30 vezes mais potente que o cortisol e não possui atividade mineralocorticóide, o que a torna uma droga especialmente importante para o estímulo específico da atividade glicocorticóide (GUYTON e HALL, 2006).

Apesar de apresentarem em sua denominação o seu efeito característico sobre o metabolismo dos carboidratos, os glicocorticóides atuam praticamente sobre todos os órgãos e tecidos. O mecanismo fundamental que promove a transativação ou a transrepressão gênica inicia-se com o hormônio, que é lipofílico, atravessando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva. No citoplasma ligam-se a receptores protéicos específicos, que são proteínas citoplasmáticas com estrutura contendo domínios comuns a outros membros da superfamília de receptores nucleares. Atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes alvo em resposta a um sinal hormonal específico (WRIGHT *et al.*, 1993).

A osteogênese pode ser interferida pela ação de fatores biológicos, como o uso de anti-inflamatórios esteroidais (AIES). A dexametasona é um anti-inflamatório esteroidal, amplamente utilizada na prática clínica.

A causa mais comum de osteoporose secundária é a exposição crônica a glicocorticóides, que acomete principalmente o osso trabecular (BOLING, 2004).

Os AIES provocam efeitos negativos no tecido ósseo através da inibição osteoblástica (WATERS *et al.*, 2000); da alteração inflamatória na cicatrização, inibindo a formação do hematoma, diminuindo o fluxo sanguíneo e a permeabilidade capilar no foco de fratura óssea (CORNELL e LANE, 1992); da diminuição da atividade periostal, o que reduz o número de células osteogênicas (CHYUN, KREAM e RAISZ, 1984), retardando a consolidação óssea, em fraturas, osteotomias e artrodeses (MENDES *et al.*, 2001).

O uso desta droga também influencia no metabolismo ósseo de cálcio e fosfato (CHYUN, KREAM e RAISZ, 1984), pois diminui a absorção do cálcio no intestino e aumenta a secreção de hormônio paratireóideo (PTH), (WATERS *et al.*, 2000). Os glicocorticóides têm grandes efeitos na homeostasia mineral, estimulando a secreção de PTH diretamente (BOLING, 2004) e indiretamente (CIPRIANI e FARIAS, 2005). O aumento indireto ocorre devido à diminuição da absorção intestinal de cálcio e ao aumento da excreção urinária de cálcio. Há diminuição renal da reabsorção tubular de cálcio e fosfato. Esses mecanismos provocam como resultado o balanço negativo de cálcio, o que promove aumento na síntese e secreção de PTH e, como consequência, aumento da reabsorção óssea para manter o nível sérico de cálcio (CIPRIANI e FARIAS, 2005).

Mendes *et al.* (2001) verificaram que a corticoterapia prolongada em altas doses interferiu no processo de reparo da fratura, limitando a fase inflamatória e diminuindo a formação do hematoma fraturário. Retardou a produção do tecido cartilaginoso e posteriormente a sua substituição por osso trabecular, levando a um certo retardo do processo de consolidação da fratura.

Kalia, Melsen e Verna (2004) avaliaram a taxa de movimento dentário em ratos, com o uso de uma terapia a curto e longo prazo e demonstraram que a remodelação óssea pareceu abrandar em administrações agudas (dose maior comparada à dose de manutenção), e o movimento dentário aumentou quando foi realizado um tratamento crônico (dose de manutenção da atividade imunossupressora). Estes resultados sugerem que é possível tratar pacientes submetidos à terapia de corticóides com efeitos colaterais mínimos. Na fase inicial da terapia os pacientes

podem ser aconselhados a adiar o tratamento ortodôntico, uma vez que a remodelação óssea será menor, ou devem-se agendar consultas em intervalos maiores.

Cavagni *et al.* (2005) observaram que a dexametasona aumentou a progressão de perda óssea alveolar.

A dexametasona tem a capacidade de estabilizar as membranas lisossomais dos leucócitos, diminuindo a concentração destas enzimas e reduzindo a capacidade dos vasos em responder aos estímulos agressivos. Reduz a expressão endotelial das moléculas de adesão intracelular, fato que dificulta a migração leucocitária em circulação (PETTET *et al.*,1996). Diminui a angiogênese, a síntese de prostaglandinas e leucotrienos por meio do bloqueio da fosfolipase A2, enzima que promove a liberação do ácido araquidônico na lesão celular (MACEDO e OLIVEIRA, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROTOCOLO ANIMAL

Trata-se de um estudo experimental em ratos, o qual foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da UNIFENAS, sob o parecer nº 03A/2008 (ANEXO A). Foram utilizados 15 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com 50 dias de idade, pesando 250 ± 30 g, mantidos em caixas para roedores com forração de maravalha, no biotério da pós-graduação da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) em estantes ventiladas com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=5): controle (CT), anti-inflamatório não esteroidal (AINES) e anti-inflamatório esteroidal (AIES). Os animais do grupo AINES receberam doses de 12 mg/kg/dia de cetoprofeno (CAMIOTTI *et al.*, 2005) e os do grupo AIES foram submetidos ao tratamento com dexametasona na dose de 0,10 mg/Kg/dia (TENIUS, BIONDO-SIMÕES e IOSHII, 2007) por via subcutânea, em regiões anatômicas alternadas, com agulha 13 x 4,5mm, por um período de 30 dias. Nos animais do grupo CT foi administrada por via subcutânea, solução salina (0,9%), gerando a mesma condição de estresse dos animais do grupo AINES e AIES.

A administração da droga foi realizada no período da manhã. Todos os animais receberam a mesma dieta sólida (Nuvilab ®, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Durante o experimento, a ingestão líquida e a ingestão sólida foram mensuradas diariamente e o peso dos animais, semanalmente, para a caracterização do estado nutricional.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com solução 1:1 de quetamina (Francotar®) e cloridrato de xilazina (Virbaxyl® 2%) na dose de 0,10 ml/100g IM. Foi realizada tricotomia e incisão longitudinal na pele da calota craniana e da perna esquerda; o perióstio foi afastado expondo a cortical óssea. Foi produzido no osso parietal esquerdo uma cavidade de 3 mm com auxílio de um Punch trepano (figura 1). Esta falha foi mantida aberta para a verificação do osso neoformado ao término dos 30 dias de experimento. Na epífise proximal da tibia esquerda foi realizada outra falha de 3mm e implantada a biocerâmica hidroxiapatita densa (HAD). O perióstio no parietal e tibia foi reposicionado através da sutura de suas bordas com fio de seda 8.0, e a pele foi suturada com fio de algodão 4.0. A biocerâmica HAD foi produzida pelo Instituto de Química da Unicamp, apresentando 3mm de diâmetro e 3mm de comprimento.



Figura 1. Punch trepano® de 3mm.

Os animais receberam água com dipirona® por 24 horas e os respectivos tratamentos citados no protocolo animal acima. No dia seguinte à cirurgia, os animais deambulavam sem limitações significantes. Ao completar 30 dias de experimento todos

os animais sofreram eutanásia através da administração intraperitoneal (IP) de overdose de Tiopental Sódico®.

3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO

O osso parietal esquerdo e a tibia esquerda, depois de coletados, foram fixados em formalina tamponada a 10% por 48 horas e descalcificados em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 15 dias. Em seguida, os ossos foram reduzidos e incluídos em parafina para cortes histológicos. Foram realizados cortes transversais semisseriados com 6 micrômetros de espessura, depositados em lâminas. Em seguida foram corados com hematoxilina/eosina (HE) para análise morfológica (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).

O volume de osso neoformado foi obtido com o auxílio de um retículo quadrilátero de 100 pontos acoplado à ocular do microscópio. Após a contagem dos pontos foi utilizada a fórmula $V_v = P_p / P_t$ (%), onde V_v = densidade de volume ou volume relativo; P_p = quantidade de pontos sobre o osso neoformado; P_t = número total de pontos do sistema, de acordo com o princípio de Delesse proposto por Mandarim de Lacerda (1999).

Foram utilizados 4 cortes histológicos de mesma espessura para cada área. Esta análise foi feita com a objetiva do microscópio luz Olympus CBB padronizada em aumento de 400 vezes (Carls Zeiss) para a análise do volume ósseo neoformado. Os cortes histológicos foram selecionados aleatoriamente, e somente após a contagem dos pontos sobre a área foi feita a identificação dos grupos. Todas as análises histológicas foram feitas por um único avaliador.

3.4 TESTE MECÂNICO

Para a realização do teste mecânico, o fêmur esquerdo dos animais foram coletados, limpos e acondicionados em gaze embebida em solução fisiológica (0.9%) e armazenado em *freezer* (-20°C) até o dia anterior ao ensaio.

Os fêmures foram submetidos a teste mecânico de resistência no Laboratório de Propriedades Mecânicas da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp. O ensaio mecânico foi realizado em um módulo de flexão de três pontos, MTS TestStar II (figura 2A), utilizando um célula de carga de 100 Kgf, a uma velocidade de 1.3 mm/min (figura 2B). A distância entre as duas extremidades ósseas foi de 50 mm e para se obter o valor da resistência, uma carga foi aplicada no terço médio do osso (diáfise) por meio de uma ponta, acoplada em uma máquina de ensaio universal (figura 2B) (SOARES *et al.*, 2010). A força máxima necessária para a ruptura completa dos fêmures foi obtida após uma célula de carga registrada pelo Módulo de Flexão MTS em Newton (N).

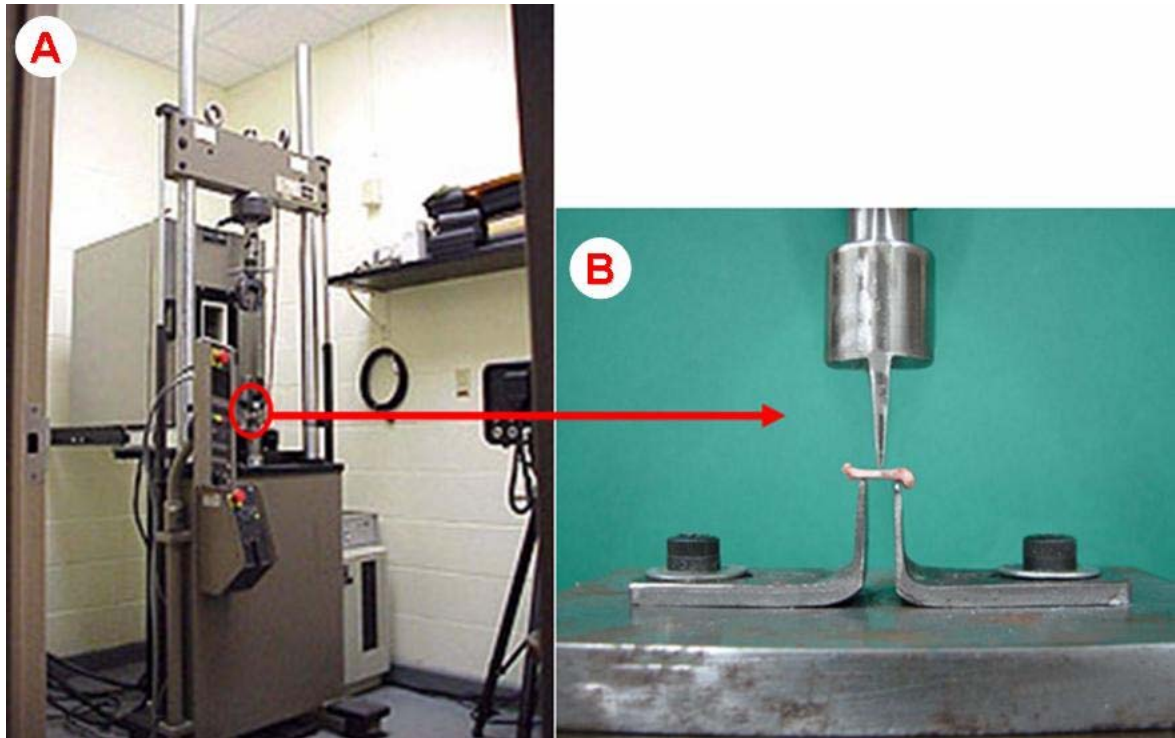


Figura 2. Módulo de flexão MTS (modelo TESTSTAR II) (A); teste de flexão do fêmur em 3 pontos a uma velocidade de 0,05 mm/s (1.3 mm/min) com célula de carga de 100 Kgf (B).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada com teste de Tukey-Kramer. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 AINES E AIES NÃO ALTERARAM O GANHO DE PESO DOS ANIMAIS

O consumo diário de água e de ração foi satisfatório entre os grupos. Entretanto, os animais dos grupos AINES e AIES apresentaram menor ingestão de ração quando comparados com os animais dos grupos CT (tabela 1). O ganho de peso ao longo do experimento não apresentou diferenças significativas entre os grupos (tabela 1), mostrando não haver desnutrição protéica e desidratação nos grupos estudados.

Tabela 1. Comparação do consumo diário da dieta líquida (água), da dieta sólida (ração) e do ganho de peso (ΔP) ao longo do experimento de ratos controle tratados com AINES e AIES.

	CT	AINES	AIES
Dieta Líquida (mL)	18,9 \pm 1	15,8 \pm 1	15,7 \pm 0,5
Dieta Sólida (g)	31,6 \pm 1	26,4 \pm 0,5*	25,5 \pm 1*
ΔP (g)	235 \pm 8	230,2 \pm 7	234 \pm 10

* $p < 0.05$ comparado com CT; Dados expressos em média \pm EPM.

4.2 AINES E AIES DIMINUÍRAM O VOLUME DE OSSO NEOFORMADO AO REDOR DA HAD NA TÍBIA

Microscopicamente observamos osso neoformado no sítio de implantação da HAD na epífise proximal da tíbia esquerda em todos os grupos, estando a neoformação continua com a cortical óssea (figura 3). As superfícies dos blocos de HAD apresentaram fissuras preenchidas, demonstrando osseocondução na HAD (figura 3).

Entretanto, nos animais dos grupos AINES e AIES o volume ósseo neoformado foi menor que no grupo CT (figura 3 e tabela 2).



Figura 3. Fotomicrografia transversal do sítio de implantação da HAD na epífise proximal da tíbia mostrando menor volume de osso neoformado (seta) nos animais dos grupos AINES e AIES quando comparados com o grupo CT. (HE, 400X).

4.3 AINES E AIES DIMINUÍRAM O VOLUME DE OSSO NEOFORMADO NA FALHA ÓSSEA DO OSSO PARIETAL

Nesse período de experimento, microscopicamente, os animais dos grupos AINES e AIES apresentaram um menor volume de osso neoformado na falha óssea do osso parietal quando comparados ao grupo CT (figura 4, 5 e tabela 2). Além disso, os animais dos grupos AINES e AIES apresentaram predominância de osso imaturo em quase toda a extensão da falha, não preenchendo a falha óssea (figura 5). Os animais do grupo CT apresentaram osso maturo nas extremidades das falhas e osso imaturo nas partes centrais, preenchendo completamente a falha óssea (figura 5).

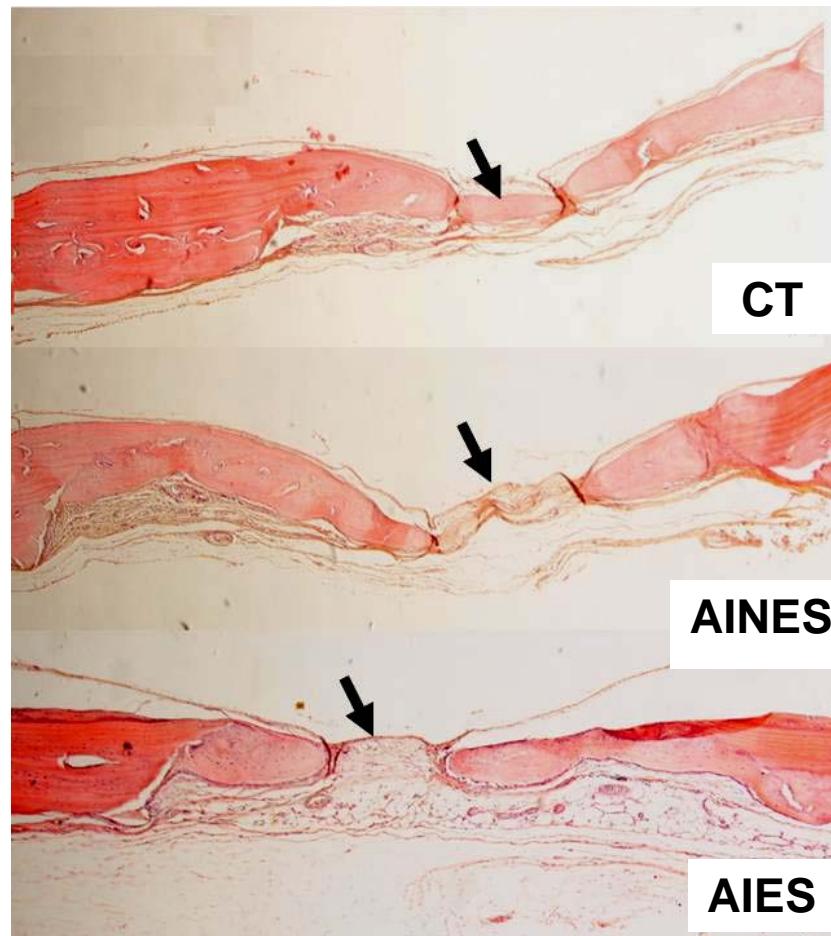


Figura 4. Fotomicrografia frontal do osso parietal exibindo menor neoformação na falha óssea dos animais dos grupos AINES e AIES em comparação com os do grupo CT. (HE 40X)

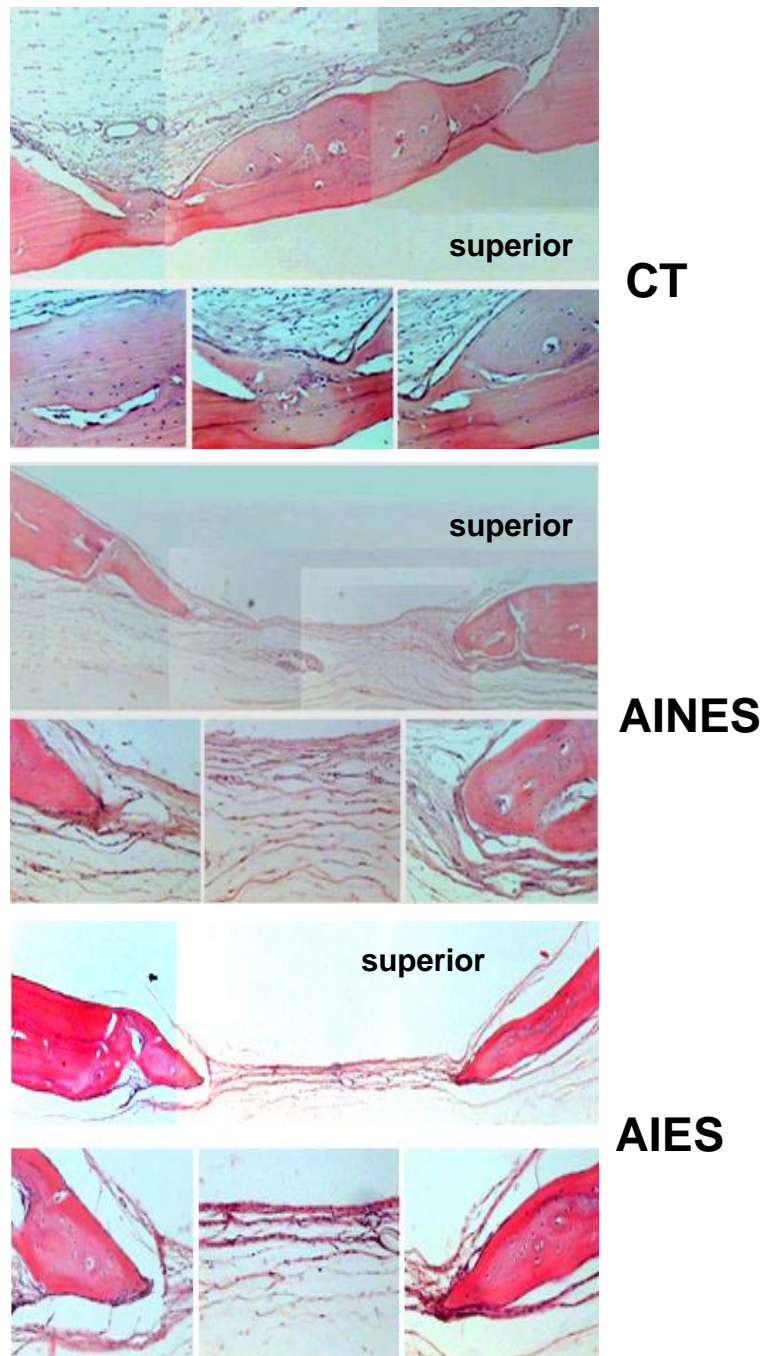


Figura 5- Fotomicrografia frontal do osso parietal exibindo menor neoformação na falha óssea dos animais dos grupos AINES e AIES em comparação com os do grupo CT (painel superior HE 40X e painel inferior HE 400x).

Tabela 2. Volume de osso neoformado ao redor da HAD implantado na tíbia esquerda e neoformação na falha óssea do parietal de ratos controle tratados com AINES e AIES.

Volume Ósseo	CT	AINES	AIES
Osso Neoformado (%) ao redor do implante de HAD	41,2 ±1,7	30 ± 2,5*	28,6 ± 1,3*
Osso Neoformado (%) na falha óssea do osso parietal	15,4 ±0,5	8,4 ± 0,5*	7,8 ± 0,4*

*p<0.05 comparado com o grupo CT. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

4.4 AINES E AIES DIMINUÍRAM A PROPRIEDADE ESTRUTURAL DO FÊMUR

Na análise da propriedade estrutural força máxima foi observado que os animais dos grupos AINES e AIES necessitam de menor força máxima para a ruptura completa dos fêmures quando comparados com do grupo CT.

Tabela 3. Propriedade estrutural (força máxima) registrada pelo módulo de flexão MTS (modelo TESTSTAR II) no ensaio mecânico dos animais dos grupos CT, AINES e AIES.

Propriedade estrutural	CT	AINES	AIES
Força máxima (N)	97±1	88±2*	85±2*

*p<0.05 comparado com o grupo CT; Dados expressos em média ± erro padrão da média.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que todos os animais ganharam peso ao longo do experimento. O cetoprofeno (AINES) e a dexametasona (AIES) no protocolo empregado não interferiu na ingestão líquida dos animais desses grupos. Entretanto, diminuiu a quantidade da dieta sólida ingerida nesses grupos quando comparados com o grupo CT. A porcentagem de osso neoformado ao redor da HAD na tíbia e na falha óssea no osso parietal foi menor nos grupos AINES e AIES quando comparados ao grupo CT. A força máxima necessária para ruptura completa dos fêmures nos animais dos grupos AINES e AIES foi inferior à força necessária para romper os fêmures dos animais dos grupos CT.

Os experimentos envolvendo o uso prolongado de drogas necessitam de uma atenção especial referente ao estado nutricional dos animais, pois as variações no consumo de dieta sólida e líquida podem provocar modificações nas respostas biológicas dos animais em experimentação (WEISBROTH *et al.*, 1977). Svendsen e Hau (1984) preconizaram que, para manter o estado nutricional adequado do rato e evitar a desnutrição e a desidratação, eles devem apresentar consumo médio diário de 25g de ração e de 15 a 80 mL de água. Nossos resultados mostraram que as alterações ósseas observadas nos grupos AINES e AIES não foram decorrentes da desnutrição protéica ou desidratação, pois todos os animais dos grupos estudados ganharam peso durante o experimento, e a ingestão sólida e líquida permaneceu dentro dos padrões preconizados por Svendsen e Hau (1984). De acordo com Palencia *et al.* (1994), a ingestão sólida inferior a 25 g/dia e as perdas de peso acentuadas ao longo do experimento caracterizam a desnutrição em roedores. A variação de peso corpóreo no

nosso estudo não foi diferente dos estudos citados, o que provavelmente não interferiu na resposta biológica do tecido ósseo dos animais do grupo AINES e AIES .

Alguns autores sugerem que os principais fatores que interferem com os resultados obtidos com a administração de AINES são a dose e o tempo de tratamento (MULLIS *et al.*, 2006), além de diferenças intra e interespécies na sensibilidade às drogas, de possíveis fatores locais e sistêmicos compensatórios, da interferência de condições como idade, ritmo da remodelação óssea e doenças associadas, e também da farmacocinética dessas drogas em roedores versus humanos (RADI e KHAN, 2005). Os resultados dos animais do grupo AINES em nossos estudos podem ter ocorrido em resposta à alta dosagem do cetoprofeno utilizada: 12 mg/ Kg, descrita nos estudos de Camilotti *et al.*, (2005). Porém, Silva (2004), trabalhando com extrapolação alométrica do cetoprofeno em *Rattus norvegicus*, indicou a dose de 2 mg/kg, via subcutânea e, segundo Flecknell (1996), essa dose garante boa analgesia. A alometria é um método que permite extrapolar indicações posológicas de espécies mais comuns e conhecidas para espécies onde não foram realizados estudos farmacocinéticos da droga em questão, levando em conta, entre outros, o tamanho corporal, o metabolismo e a taxa basal (SILVA, 2004).

A diminuição da ingestão alimentar dos animais do grupo AINES pode estar relacionada com os efeitos adversos gerais dos AINES como, por exemplo, a dispepsia, náuseas e vômitos, em grande parte causados por inibição da COX1 na mucosa gástrica (RANG, DALE e RITTER, 2004) e em resposta à alta dosagem do cetoprofeno utilizado no nosso experimento. O grupo AIES apresentou uma ingestão sólida inferior ao grupo CT. Fato semelhante foi encontrado nos estudos de Santos *et al.* (2007), que observaram uma diminuição no consumo alimentar dos ratos tratados com

dexametasona. A dexametasona aumenta a taxa de gliconeogênese e reduz a utilização da glicose na célula, elevando a concentração sanguínea de glicose. Essa elevação nos níveis plasmáticos de glicose estimula a secreção de insulina. Assim, a redução do consumo alimentar nos grupo AIES pode ser explicada pelo efeito anorexígeno exercido pela insulina sobre receptores localizados no núcleo arqueado do hipotálamo. Esta região é conhecida por estar envolvida com o controle alimentar. Injeções de insulina na região intracerebroventricular reduzem em 50% a ingestão de alimento em ratos normais, confirmando tal pressuposto (TORSONI *et al.*, 2003).

O tecido ósseo é fonte abundante de prostaglandinas, principalmente a PGE₂, que são produzidas pelos osteoblastos sob estímulo principalmente da COX-2 (LAMANO-CARVALHO, 2007). As prostaglandinas (PGs), que podem, em determinadas circunstâncias, estimular a reabsorção óssea, são também responsáveis por mediar importantes eventos relacionados ao processo de formação e reparo ósseo (KAWAGUCHI *et al.*, 1995). Os AINES, por inibirem a síntese de COX-1 e COX-2, reduzem a síntese de PGs provenientes da metabolização do ácido araquidônico (EMERY, 1996). Estudos têm demonstrado que a enzima COX-2 exerce papel crucial sobre o processo de reparo ósseo, e importantes mecanismos biológicos podem explicar esta associação (SATO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2002). De acordo com Sato *et al.*, (1997), ambas as enzimas, COX-1 e COX-2, podem estar envolvidas com a osteogênese, sendo que a COX-2 apresenta essencial importância na maturação dos osteoblastos após o início do processo de formação óssea. Além disso, a COX-2 é requerida em ambos os processos de ossificação (endocondral e intramembranosa), enquanto que a COX-1 não possui papel crítico nesta ação (ZHANG *et al.*, 2002). Adicionalmente, Zhang *et al.* (2002) demonstraram que a COX-2 regula importantes

fatores de transcrição, tais como *cbfa-1* (*core binding factor alpha 1*) e *osterix*, os quais exercem papel fundamental na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). O *cbfa-1*, um membro da família Runx dos fatores de transcrição, está envolvido na regulação de genes específicos da osteoblastogênese, controlando, por exemplo, a produção de osteocalcina, colágeno tipo I, osteopontina e sialoproteína óssea (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). Além disso, a presença desse fator de transcrição é essencial na produção de osteoblastos, já que estudos demonstraram que camundongos nocautes para *cbfa-1* não são capazes de produzir células osteoblásticas (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). *Osterix* é um outro fator de transcrição que também tem grande importância no processo de formação óssea (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Semelhantemente ao que ocorre com animais que não expressam *cbfa-1* (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997), camundongos nocautes para *osterix* apresentam falta de osteoblastos, além de não ativarem importantes marcadores ligados à osteoblastogênese, tais como osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea, havendo persistência de células mesenquimais indiferenciadas (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Outro importante aspecto que pode explicar o efeito negativo dos inibidores seletivos de COX-2 sobre o reparo ósseo é o fato de haver uma interação entre os metabólitos da COX-2 e as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) no processo de reparo do tecido ósseo. Determinadas BMPs, tais como BMP-2, BMP-4 e BMP-7, não somente estimulam a diferenciação osteoblástica de células osteoprogenitoras, como também transdiferenciam células mesenquimais não osteogênicas em células da linhagem osteoblástica (YAMAGUCHI *et al.*, 1996). De maneira geral, a COX-2 é induzida nas fases iniciais do processo de reparo ósseo e produz aumentadas quantidades de PGE₂. As PGE₂, por sua vez,

podem induzir a produção de BMPs e/ou cooperar com as BMPs para que seja elevada a expressão de *cbfa-1* e *osterix* (NAKASHIMA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002). Além disso, parece existir uma interação sinérgica entre *cbfa-1* e BMP-2 para que a diferenciação osteoblástica seja estimulada, tanto *in vitro* como *in vivo* (YANG *et al.*, 2003). Estudos sugerem também que a BMP-2 pode induzir a expressão de *osterix* independentemente de *cbfa-1* (CELIL e CAMPBELL, 2005), embora *osterix* tenha sido sugerido como dependente do fator de transcrição *cbfa-1* (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Outros estudos têm relatado mecanismos alternativos que podem agir independente de, ou em paralelo ao *cbfa-1*, durante a progressão da diferenciação da linhagem osteoblástica (JADLOWIEC *et al.*, 2004). De acordo com estes autores, além do *cbfa-1*, outros componentes são necessários para regular a expressão de *osterix* durante a osteoblastogênese e, adicionalmente, os estudos sugerem que mecanismos independentes de *cbfa-1/osterix* devam ainda ser elucidados. Arikawa *et al.*, (2004) observaram que células tronco mesenquimais humanas constitutivamente expressavam COX-2, e que a inibição da síntese de PGE2 por um inibidor seletivo de COX-2, suprimia a expressão de BMP-2. Tais observações sugerem que a PGE2, endogenamente produzida por COX-2, seja essencial para a adequada expressão de BMP-2. Adicionalmente, a enzima COX-2 parece ser necessária para que ocorra a máxima osteogênese na presença de BMP-2 e a complementação de BMP-2 à COX-2, *in vitro*, suporta a possibilidade de que os eventos associados às BMPs possam ser dependentes de metabólicos da COX (ZHANG *et al.*, 2002). Deste modo, de acordo com os mecanismos discutidos, a COX-2 regula fatores de transcrição associados à osteogênese e controla a diferenciação osteoblástica. Portanto, a hipótese da redução no processo osteoblastogênico ao redor do implante da HAD, da redução na

ossificação na falha do osso parietal e a diminuição da resistência óssea nos fêmures dos animais do grupo AINES em comparação com o CT, em nossos estudos, podem ser os efeitos prejudiciais do cetoprofeno na inibição da COX-2 sobre o metabolismo ósseo em decorrência da alta dosagem empregada, 6 vezes maior que a descrita por Silva (2004) e da terapia anti-inflamatória prolongada do cetoprofeno.

Vários mecanismos decorrentes do uso dos AIES concorrem para prejudicar a osteogênese e a diminuição da resistência óssea, dentre eles a diminuição da absorção intestinal e o aumento da excreção urinária de cálcio, que produz balanço negativo deste mineral, estimulando assim a síntese e secreção de paratormônio (PTH) e consequente aumento da reabsorção óssea para manter o nível sérico do cálcio (CIPRIANI e FARIAS, 2005). Além disso, os AIES diminuem a síntese de prostaglandinas e leucotrienos por meio do bloqueio da fosfolipase A2, enzima que hidrolisa os fosfolídeos de membrana celular, liberando para o citoplasma o ácido araquidônico, que será convertido em endoperóxidos cíclicos instáveis, pela ação das cicloxigenases. Estes por sua vez se transformam em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (RANG, DALE e RITTER, 2004). As prostaglandinas, principalmente a PGE2, são produzidas pelos osteoblastos sob estímulo principalmente da COX2, cuja expressão é controlada pelos hormônios, citocinas e fatores de crescimento que controlam a remodelação óssea. No tecido ósseo, as prostaglandinas, desempenham uma importante função fisiológica, aumentando a formação óssea em resposta ao estímulo mecânico, em animais e humanos (GAJRAJ, 2003). Os AIES inibem a transcrição de vários genes de citocinas, como a interleucina 6 (IL-6) (RANG, DALE e RITTER, 2004). A IL6 e 11 estimulam a reabsorção, mas também a formação óssea, pois os osteoclastos, além de sua função osteolítica, desempenham importante papel

no desenvolvimento e crescimento ósseos, ao liberarem esses fatores da matriz extracelular mineralizada. Tais fatores estimulam os osteoblastos a se proliferarem e a sintetizarem proteínas da matriz. Ao término do ciclo da reabsorção, os osteoclastos secretam proteínas que servirão de substrato para a fixação do osteoblasto (MEGHJL, 1992).

Os AIES inibem a indução dos genes nos osteoblastos mediada pela vitamina D3 e modificam a transcrição dos genes da colagenase. O uso prolongado dos AIES reduzem a função dos osteoblastos e aumentam a atividade dos osteoclastos (RANG *et al.*, 2004). A transcrição do RNAm para o colágeno tipo I é diminuída pela ação dos AIES (FRANK *et al.*, 1996). Os glicocorticóides aumentam ou diminuem a transcrição de muitos genes, alterando a síntese de RNAm que gera as proteínas que agem como mediadoras em múltiplos efeitos fisiológicos no osso (GUYTON e HALL, 2006). Deste modo, de acordo com os mecanismos discutidos, os animais do grupo AIES, apresentaram menor porcentagem de osso neoformado ao redor do implante da HAD, redução na ossificação na falha do osso parietal e a diminuição da resistência óssea nos fêmures, em resposta induzida pela dexametasona sobre os vários processos que envolveram a osteogênese.

6 CONCLUSÃO

Com bases nos resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que o cetoprofeno e a dexametasona interferiram na osteogênese e ao redor do implante de HAD e alteraram a propriedade estrutural do osso em ratos, por alterarem o metabolismo do tecido ósseo, provavelmente pela inibição da COX2 e diminuição das prostaglandinas .

A osseointegração dos implantes de HAD pode ser esperada mesmo em animais e humanos submetidos a tratamento prolongado com cetoprofeno e dexametasona. No entanto, com menor volume, o que pode comprometer a estabilidade e manutenção do implante.

7 REFERÊNCIAS

AKMAN, S. *et al.* Effect of diclofenaco sodium on union of tibial fractures in rats. **Adv. Ther.**, v. 19, n. 3, p. 119-125, May /Jun. 2002.

ALVES, A.S. *et al.* Emprego do antiinflamatório não esteróide ketoprofeno na analgesia preventiva em cães. **Ciência Rural**, v.31, p.439-444, 2001.

ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, São Paulo, v.6, n. 1, p. S159-S165, 2008.

ARAKAKI, M. *et al.* Onlay silicone and hydroxyapatite-tricalciumphosphate composite (HAP-TCP) blocks interfere with nasal bone growth in rabbits. **Cleft Palate-Craniof. J.**, v.32, p.282-289, 1995.

ARIKAWA, T. *et al.* Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol**, v. 200, n.3, p. 400-406, 2004.

BANDEIRA, F. *et al.* **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 390 p.

BERTRAN, C. A.; KAWACHI, E. Y.; REIS, R. R.; ALVES, O. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim. Nova**, v.23, n.4, p.123-129, jun./ago. 2000.

BOLING, E. P. Secondary osteoporosis: underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. **Clin Ther.**, v. 26, p. 1-14, 2004.

CAMILI, J. A. *et al.* Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. **Arch Oral Biol (Archives of oral biology)**, v. 49, p.747-753, sept. 2004.

CAMILOTTI, A. G. *et al.* Avaliação radiográfica do efeito do meloxicam e cetoprofeno na periodontite induzida por ligadura em ratos. **Revista Periodontia**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 5-9, abr./jun. 2005.

CAVAGNI, J. *et al.* Efeito da dexametasona na patogênese da doença periodontal induzida por ligadura em ratos Wistar. **Braz. oral res.**, v.19, n.4, p.290-294, Oct./Dec. 2005.

CELIL, A. B.; CAMPBELL, P. G. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 280, n.36, p. 31.353-31.359, 2005.

CHYUN, Y. S.; KREAM, B. E.; RAISZ, L. G. Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. **Endocrinology**, v.114, n.2, p.477-480, 1984.

CIPRIANI, R.; FARIAS, M. L. Osteoporosis after solid organs transplantation. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 49, p. 396 -377, 2005.

CORNELL, C.; LANE, M. L. Newest factors in fracture healing. **Clin Orthop.**, v.277, p. 297-311, 1992.

CURVÊLLO, V. P. **Efeito do antiinflamatório não esteroideal rofecoxib (Vioxx) no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos estressados: Estudo microscópico.** 2004. 105 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica em Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial) - Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília, Marília, 2004.

DUCY, P. *et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v. 89, p. 747-754, 1997.

DUONG, L. T.; RODAN, G. A. Regulation of osteoclast formation and function. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 2, p. 95-104, 2001.

EMERY, P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition. **Scand J Rheumatol**, v. 102, p. 23-28, 1996. Suppl. I.

FLECKNELL, P.A. **Laboratory animal anaesthesia.** 2 ed. San Diego: Academic Press, 1996, p.216-223.

FRANK, S. *et al.* Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. **J Biol Chem**, v.271, p. 10.188-10.193, 1996.

GAJRAJ, N. M. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone healing. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 28, p. 456-465, 2003.

GRISNEAUX, E. *et al.* Comparison of ketoprofen and carprofen administered prior to orthopedic surgery for control of postoperative pain in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 215, n.8, p.1105-1110, 1999.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HILL, N. M.; HORNE, J. G.; DEVANE, P. A. Donor site morbidity in the iliac crest bone graft. **Aust. N. Z. J. Surg**, v.69, n.10, p.726, Oct. 1999.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **Br J Orthod**, v. 25, n. 2, p. 101-107, 1998.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. K. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 82, n. 6, p. 594-606, 1996.

INSEL, P. A. Fármacos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G. *et al.* **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: Mc Graw-Hill, 1996. p. 450-480.

JADLOWIEC, J. *et al.* Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 279, n. 51, p. 53.323-53.330, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, S. M. M. L. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KALIA, S.; MELSEN, B.; VERNA, C. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in acute and chronic corticosteroid treatment. **Orthod Craniofac Res**, Oxford, v. 7, p.26-34, 2004.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In: **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Panamericana, 1999. cap.3, p. 40-75.

KAWAGUCHI, H. *et al.* The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. **Clin Orthop.**, v.313, p. 36-46, 1995.

KAWAMOTO, S.; NAGAOKA, E. The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. **J Oral Rehabil**, v. 27, n. 7, p. 587-594, 2000.

KESSEL, R. G. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: **Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos**. Trad. M.c. Engelhardt. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KOMORI, T. *et al.* Targeted disruption of cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755-764, 1997.

KUMAR, A.; JAFFIN, R. A.; BERMAN, C. The effect of smoking on achieving osseointegration of surface-modified implants – A Clinical Report. **Int J Oral Maxillofacial Implants**, v.17, n.6, p.816-819, 2002.

LAMANO-CARVALHO, T. L. Efeito dos anti-inflamatórios não-esteroidais convencionais e seletivos para COX-2 sobre o reparo ósseo. **Acta Ortop Bras.**, v. 15, n. 3, p.166-168, 2007.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 395, p.81-98, 2002.

- MACEDO, J. M. S.; OLIVEIRA, I. R. Corticosteróides. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 760-775.
- MANDARIN de LACERDA, C. A. Whats is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The exemple of the stereology. **Braz. J. Morphol**, v. 16, n. 2, p.131-139, 1999.
- MARTINS, M. V. *et al.* Evaluation of digital optical density of bone repair in rats medicated with ketoprofen. **Braz. Dent. J.**, v. 16, n.3. p. 207-212, set./ dez. 2005.
- MATSUDA, E. I. *et al.* Estudo comparativo entre o ketoprofeno e o flunixin meglumine no tratamento da dor pós-operatória de cães submetidos a cirurgia ortopédica. **Clin Vet.**, v. 4, p. 19-22, 1999.
- MEADLE, E. A.; SMITH, W. L.; WINTT, D. L. Differencial inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal antiinflammatory drugs. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n.9, p.6610-6614, Mar. 1993.
- MEGHJL, S. Bone remodeling. **Br Drent**, v. 172, n. 6, p. 235-242, 1992.
- MENDES, P. H. B. *et al.* Consolidação da fratura após o uso prolongado de corticóide: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.36, n.9, p.345-351, set. 2001.
- MOURAD, L. A. Structure and function of the musculoskeletal system. In: McCANCE, K. L.; HUETHER, S. E. **Pathophysiology**: the biologic basis for disease in adults and children. 3. ed. Sant Louis: Mosby, 1997. cap. 41, p. 1405-1485.
- MULLIS, B. H. *et al.* Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. **Injury, Int J Care Injured** , v. 37, p. 827-837, 2006.
- MUNDY, G. R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, v. 24, n. 5, p. 35-38, 1999. Suppl.
- NAKASHIMA, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v.108, p.17-29, 2002.
- NIEMI, L. *et al.* Comparison of parenteral diclofenac and ketoprofen for postoperative pain relief after maxillofacial surgery. **Acta Anaest Scand**, v. 39, p. 96-99, 1995.
- ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. **Biomaterial**, v.21, n.2, p.143-146, Jan. 2000.
- PALENCIA, G. *et al.* Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: a study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of larger human groups. **J. Stud. Alcohol**, v.55, n.1, p. 113-120, 1994.

PELISSONI, L. G. R. *et al.* Influência do cetoprofeno na consolidação óssea de ulnas osteotomizadas de coelhos. Estudo qualitativo e quantitativo através de programas computacionais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.5, p.452-457, Sep./Oct. 2003.

PETTET, G. J. *et al.* A model of wound-healing angiogenesis in soft tissue. **Math Biosci**, v.136, n. 1, p.35-63, 1996.

RADI, Z. A.; KHAN, N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon and ligament healing. **Inflamma Res.**, v. 54, p.358-366, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, I. M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SAKAKURA, C. E.; MARCANTONIO, J. E.; REZENDE, M. L. R. O efeito do tabagismo na implantodontia. **BCI - Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v.8, n.32, p.276-280, out./dez. 2001.

SANTOS, C. L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 101-110, July./Sept. 2007

SATO, Y. *et al.* Expression of cyclooxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity. **J Med Dent Sci.**, v. 44, n.4, p. 81-92, 1997.

SCHENK, R. K. Bone regeneration: biologic basis. In: BUSER. D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Guided bone regeneration in implant dentistry**. Chicago: Quintessence Books, 1994. cap. 3, p. 49-100.

SILVA, A. A. **Avaliação clínica de *Rattus norvegicus* após terapia antiinflamatória com inibidor seletivo ou não para COX-2 por extrapolação alométrica**. 2004, 104 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMÕES, R. D. *et al.* Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose. In: **Ginecologia Endócrina**. São Paulo: Editora Atheneu, 1995.

SOARES, E. A. *et al.* Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neof ormation around hydroxyapatite implants. **Journal of Bone and Mineral Metabolism.**, v. 28, n. 1, p. 101-107, Jan. 2010.

SVENDSEN, P.; HAU, J. **Handbook of laboratory animal science**. London: CRC Press, 1984. v.1.

- TASAKA, A.C. Anti-inflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 21, p.225- 250.
- TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n.2, p. 141-149, 2007.
- TORSONI, M. A. *et al.* Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v. 285, n. 1, 48-51, p. E216–223, 2003.
- TORTORA, G. J.; GRAMBOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. Regeneração e cicatrização. In: **Inflamação: uma revisão do processo**. 4 ed. São Paulo: Quintessence, 1996. cap. 7. p. 146-147.
- VIDIGAL JÚNIOR, G. M.; GOISMAN, M. Osseointegração × biointegração: uma análise crítica. **Rev. Bras. Odontol.**, v.4, p.54-56, 2003.
- WATERS, R. V. *et al.* Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. **Acta Orthop Scand**, v. 71, p.317-321, 2000.
- WEISBROTH, S.H.; PAGANELLI, R.G.; SALVIA, M. Evaluation of a disposable system during shipment of laboratory rats and mice. **Lab. Anim.Sci.**, v.27, p.186-194, 1977.
- WRIGHT, A. P. *et al.* Structure and function of the glucocorticoid receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 47, n.1-6, p.11-19, 1993.
- YAMAGUCHI, A. *et al.* Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 220, n. 2, p. 366-371, 1996.
- YANG, S. *et al.* In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res.**, v.18, n.4, p. 705-715, 2003.
- ZANABONI, G. *et al.* Stability and Networks of Hydrogen Bonds of the Collagen Triple Helical Structure: Influence of pH and Chaotropic Nature of Three Anions. **Matrix Biology**, v. 19, p. 511- 520, 2000.
- ZHANG, X. *et al.* Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **J Clin Invest**, v.109, p. 1405-1415, 2002.

8 ANEXO

UNIFENAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N.º 03A/2008

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, Setor de Experimentação Animal, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **EFEITOS DA DEXAMETASONA E DO CETOPROFENO SOBRE A RESISTÊNCIA MECÂNICA EM OSSO E NA OSTEOGÊNESE AO REDOR DE IMPLANTES EM RATOS**, de autoria do Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado para fins de início da pesquisa.

Alfenas, 25 de abril de 2008.


Profª Helena-Engel Velano
Coordenadora do CEP



