

PEDRO CARVALHO CASSINO

**SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E GÁLIO PARA REPARAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS EM RATO**

CAMPO GRANDE
2014

PEDRO CARVALHO CASSINO

**SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E GÁLIO PARA REPARAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS EM RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

CAMPO GRANDE
2014

CASSINO, Pedro Carvalho

Suplementação de zinco e gálio em defeito ósseo de ratos.
Campo Grande, MS, 2014.
47 p ; 30cm.

Orientador: Profª Drª Iandara Schettert Silva
Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na
Região Centro-Oeste.

FOLHA DE APROVAÇÃO

PEDRO CARVALHO CASSINO

SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E GÁLIO EM DEFEITO ÓSSEO DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____.

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iandara Schettert Silva
Instituição – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Augustin Malzac
Instituição - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Petr Melnikov
Instituição - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, minha esposa, meus pais, e meus familiares que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas pessoas que com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigado, pela inspiração, apoio e, ensino diário.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Iandara Schettert Silva, por todo empenho, exigência, amizade, compreensão e, acima de tudo, sabedoria.

A minha esposa Camila Tainá Samúdio Alvarez Cassino, pelo auxílio com a escrita de dissertação e pela compreensão nos momentos de estudo.

À equipe do Laboratório de Metabolismo Mineral e Biomateriais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pelo auxílio com a produção dos materiais, na análise dos dados e que gentilmente me acolheram durante o período de estudo.

Ao Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a realização de um grande sonho, e a concretização desse projeto.

RESUMO

CASSINO, Pedro Carvalho. Suplementação de zinco e gálio em defeito ósseo de ratos. [dissertação]. Campo Grande: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2014. 46p.

Defeitos ósseos incompletos são modelos para o estudo da regeneração do osso e possuem semelhança com o reparo da fratura, sendo que a diminuição ou ausência destes constitui sério problema ao cirurgião. Ainda que o reparo ósseo seja definido como um fato não isolado. O processo de regeneração tecidual é generalizado, incluindo tanto tecidos moles como os duros. As etapas do reparo normal das feridas de tecidos moles como a sequência de inflamação, fibroplasia e remodelação. Estudos apontam que o gálio tem eficácia no tratamento de diversas doenças, tendo com principal efeito a capacidade de suprimir a reabsorção óssea e consequentemente elevar os níveis de cálcio no sangue, além de possuir atividade inibitória nas reabsorções ósseas pela ação nos osteoclastos e sua característica de estimular os osteoblastos, favorecendo a neoformação óssea. O zinco possui efeito estimulatório na formação óssea tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo*. Além de estimular a proliferação e diferenciação de células osteoblasticas, o zinco promove um efeito inibitório na reabsorção óssea, especificamente na formação das células precursoras de osteoclastos na medula óssea. O uso da microtomografia por raio-x, proporciona medidas quantitativas e tridimensionais da estrutura e mineralização do calo ósseo e essas medidas podem estar relacionadas a rigidez e resistência mecânica do calo. Além de quantificar as estruturas ósseas permite analisar a remodelação, mineralização, volume e microarquitetura do tecido. Sendo assim o objetivo do presente estudo é avaliar o uso da suplementação de zinco e gálio em reparo de defeitos ósseos em ratos, caracterizando a estrutura do reparo ósseo utilizando a microtomografia de Rx. Em conclusão observamos que a cicatrização óssea se mostrou presente tanto radiograficamente, quanto nas imagens por microtomografia, em graus variáveis de acordo com o tempo de pós-operatório, mostrando uma correlação positiva.

Palavras-chave: Microtomografia; reparo ósseo; morfometria.

ABSTRACT

CASSINO, Pedro Carvalho. Supplementation of zinc and gallium bone defect in rats. [dissertation]. Campo Grande: Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, 2014. 46p.

Incomplete bony defects are models for the study of bone regeneration and have resemblance to repair the fracture, and the reduction or absence of these is a serious problem to the surgeon. Although bone repair is defined as a non-isolated incident. The process is generalized tissue regeneration, including both hard and soft tissues. The steps of the normal repair of wounds of soft tissues as a result of inflammation, fibroplasia and remodeling. Studies show that gallium is effective in treating various diseases, and main effect with the ability to suppress bone resorption and thereby increase levels of calcium in the blood, as well as having inhibitory activity on bone resorption by acting on osteoclasts and their characteristic stimulate osteoblasts, promoting bone formation. Zinc has a stimulatory effect on bone formation has been demonstrated in vitro and in vivo. In addition to stimulating the proliferation and differentiation of osteoblastic cells, zinc promotes an inhibitory effect on bone resorption, specifically in the formation of osteoclast precursor cells in the bone marrow. The use of x-ray microtomography for, and provides quantitative three-dimensional measurements of the structure and mineralization of the bone callus and these measures may be related to stiffness and mechanical strength of callus. In addition to quantifying bone structures allows to analyze the remodeling, mineralization, volume and tissue microarchitecture. Therefore the objective of this study is to evaluate the use of supplemental zinc and gallium in bone defect repair in rats, characterizing the structure of bone repair using microtomography Rx. In conclusion we observed that bone healing was present both radiographically as the images by microtomography, in varying degrees according to the time after surgery, showing a positive correlation.

Keywords : microtomography; bone repair; morphometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação dos parâmetros microtomográficos dos grupos controle e experimento, nos períodos de 21 e 28 dias.	33
Tabela 2 - Valores médios dos parâmetros da microtomografia, nos períodos de 21 e 28 dias conforme resultados da somatória de todos os animais no MCT analise.....	39
Tabela 3 - Valores médios dos parâmetros da microtomografia, nos grps controle e experimento, conforme resultados da somatória de todos os animais no MCT analise.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coordenação tetraédrica com átomo de zinco na posição central.....	20
Figura 2 - Organograma da distribuição dos animais nos grupos, conforme tratamento e tempo de observação do reparo ósseo.	24
Figura 3 - Procedimento cirúrgico.	25
Figura 4 - Radiografia Mediolateral e Caudocranial representando o grupo controle 28 dias, estruturas osteoarticulares sem alterações (A) e grupo controle 21 dias, com evidente ponto radiotransparente em região medial de tibia – túnel cirúrgico (B).	29
Figura 5 - Radiografia Mediolateral e Caudocranial representando o grupo experimento 28 dias, Estruturas osteoarticulares sem alterações (A) e grupo controle 28 dias, tênue forma circular radiotransparente em região medial de tibia – túnel cirúrgico (B).	30
Figura 6 - Imagens geradas pela análise da microtomografia computadorizada nos grupos controle aos 21(A) e 28 dias (B) e tratamento 21(C) e 28 dias (D).....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Densidade óssea dos grupos controle e experimento.....	34
Gráfico 2 - Volume ósseo do grupo controle e experimento.	35
Gráfico 3 - Volume do Tecido dos grupos controle e experimento.....	36
Gráfico 4 - Relação volume ósseo e volume de tecido dos grupos controle e experimento.....	36
Gráfico 5 - Espessura Trabecular dos grupos controle e experimento.....	37
Gráfico 6 - Números de Trabéculas dos grupos controle e experimento.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

μA	Microampère
μCT	Microtomógrafo
μm	Micrometro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
BS	Superfície óssea
BV	Volume ósseo
BV/TV	Relação entre volume ósseo e volume de tecido
Ca	Cálcio
cm	Centímetro
d	Dias
DM	Densidade média
DNA	Ácido desoxirribonucleico ou ADN
g	Grama
Ga	Gálio
Kv	Quilovolt
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro quadrado
mm^3	Milímetro cúbico
MP	Megapixel
N	Número
OH	Hidroxila
PO_4	Fosfato
RNA	Ácido ribonucleico ou ARN
rpm	Rotações por minuto
Rx	Raios-x
s	Segundo
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular
TV	Volume de tecido
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
W	Watt
Zn	Zinco
%	Porcentagem
/mm	Por milímetro
”	Polegada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Tecido e reparo ósseo	15
2.2 Gálio.....	17
2.3 Zinco	18
2.4 Microtomografia de Raio-X Computadorizada	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 Geral	23
3.2 Específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Delineamento experimental	24
4.2 Procedimento Cirúrgico.....	25
4.3 Procedimentos: Administração da Suspensão.....	26
4.4 Eutanásia dos Animais.....	27
4.5 Análise Morfológica	27
4.6 Análise Estatística.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8 ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem preocupa-se em reparar ou substituir partes lesadas do tecido ósseo. A recuperação deste tecido danificado por trauma ou doença representa, ainda hoje, um grande transtorno. Várias tentativas têm sido realizadas com materiais de diversas origens, mas poucos mostraram resultados satisfatórios (SANTOS, 2005).

Defeitos ósseos incompletos são ótimos modelos para o estudo da regeneração do osso e possuem semelhança com o reparo da fratura, sendo que a diminuição ou ausência destes constitui sério problema ao cirurgião (SASSIOTO, 2004).

Um defeito ósseo experimental deve ter um tamanho determinado para que não ocorra reparo espontâneo, pois só nesta situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medicamento pode ser considerado real (ALMEIDA, 2006).

O Gálio exibe ação sobre o metabolismo ósseo, com característica de agir diretamente sobre os osteoclastos, inibindo-os, e pela hipercalcemias que o seu uso resulta, tendo grande potencial nos processos que envolvem reparos ósseos (DOMINGUES, 2011).

Outro mineral que possui funções em diversas reações biológicas é o Zinco, sendo que apresenta efeitos na formação óssea *in vitro* e *in vivo* e a capacidade de suprimir a ação dos osteoclastos na reabsorção *in vivo*; sendo também um cofator para enzimas e eficaz para a replicação do DNA (MOURA, 2012).

As ferramentas de análise para verificação do processo de reparo vêm de encontro às especificidades da cicatrização e regeneração óssea. A microtomografia de raios-x computadorizada proporciona medidas quantitativas e tridimensionais da estrutura e mineralização do calo ósseo, e essas medidas podem ser relacionadas a rigidez e a resistência do calo. Sendo este um método não invasivo e tão pouco destrutivo do objeto que está sendo analisado. Com os seus recursos computacionais é possível separar o local de interesse do osso pré-existente afim desse obter medidas de valores referentes a essa área com medias de volume de osso, volume de tecido, número e espessura trabecular, tamanho da área entre outros. Tornando o Microtomógrafo uma tecnologia de grande utilidade em estudos envolvendo tecidos ósseos (INTROINI, 2011).

Sendo assim, este trabalho tem o objetivo de verificar o efeito da suplementação de nitrato Gálio e quelato de Zinco no processo de reparo ósseo em tíbia de rato Wistar, avaliando-se densidade média (DM), volume ósseo (BV), volume de tecido (TV), relação entre volume ósseo e volume de tecido (BV / TV), espessura trabecular (Tb.Th) e número de trabéculas (Tb.N) através de microtomografia de raios-x computadorizada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido e reparo ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, correspondendo a aproximadamente 15% do peso do corpo, sendo composto por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e um material intercelular constituído de uma matriz orgânica e uma inorgânica. A matriz orgânica é constituída principalmente de colágeno (95%) e representa cerca de 30% da composição do tecido ósseo. A matriz mineral é composta essencialmente de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (95%) e representa aproximadamente 70% do tecido ósseo (SILVA, 2004).

Este tecido tem origem embrionária a partir de células indiferenciadas do mesênquima, as quais apresentam capacidade de originar os múltiplos tecidos mesenquimais, como o conjuntivo, cartilaginoso, adiposo, muscular, mucoso e o hematopoiético (INTROINI, 2011).

A estrutura do tecido ósseo varia de acordo com a região do esqueleto, podendo ser classificada em porosa (trabecular), ou compacta (cortical). A microestrutura do osso poroso é composta por trabéculas cujo formato varia entre bastonetes e placas, e possuindo uma grande área superficial (HILDEBRANT et al., 1999). O osso trabecular é encontrado em extremidades dos ossos longos protegido por uma camada de osso cortical, sendo encontrado também na estrutura interna de ossos como o calcâneo, crânio, pélvis e vértebras da coluna. Este tipo de osso corresponde a 20% da constituição do esqueleto (SILVA, 2004).

O osso compacto constitui 80% do esqueleto, e forma a camada externa dos ossos. Nele as fibras de colágeno estão distribuídas na forma de lamelas que ficam paralelas umas as outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais como vasos, formando os sistemas de Havers. Entre as lamelas há lacunas onde se situam os osteócitos. Cada sistema é constituído por um longo cilindro, paralelo ao eixo longitudinal do osso (diáfise) formado por lamelas concêntricas. No centro deste cilindro existe o canal de Havers que contém vasos, nervos e tecido conjuntivo frouxo. Esses canais comunicam-se entre si, com a cavidade medular e

com a superfície externa do osso por meio de canis transversais denominados de canais de Volkmann (SILVA, 2004).

O reparo de defeitos é um bom modelo para o estudo da regeneração do osso e possui grande semelhança com o reparo primário ou direto de fraturas. Ao contrário destas últimas, os defeitos são menos sujeitos a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sanguíneo. Este modelo tem sido utilizado em muitos experimentos clássicos que analisam a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea (DOMINGUES, 2011).

Um defeito ósseo experimental deve ter um tamanho determinado para que não aconteça reparo espontâneo, e que não sofra reparo durante o período de duração do estudo, pois somente em dadas condições o potencial osteogênico do implante, o enxerto ou medicamento pode ser considerado real (ALMEIDA, 2006).

A cicatrização óssea após uma fratura ocorre através da formação de um osso novo. Este processo compreende seis estágios: hemostasia e formação do hematoma; organização do tecido de granulação; formação do calo fibroso; formação do calo ósseo primário; formação do calo ósseo secundário; reconstrução funcional da estrutura (MARTINS, 2001).

O reparo ósseo é definido como um fato não isolado. O processo de regeneração tecidual é generalizado, incluindo tanto tecidos moles como os duros. As etapas do reparo normal das feridas de tecidos moles como a sequência de inflamação, fibroplasia e remodelação. (MARTINS, 2001).

Considerando que o propósito deste reparo tecidual é reparar a continuidade entre as margens da lesão, restabelecendo as características morfofuncionais do órgão ou tecido afetado. No processo de reparo, as células progenitoras indiferenciadas têm papel fundamental, elas determinam uma série de eventos que tendem a conter o dano. Também preparam as células de reserva, que mantiveram a sua vitalidade diante a injúria (SIQUEIRA JR e DANTAS, 2000).

2.2 Gálio

O gálio é um elemento metálico do grupo 13 da tabela periódica, com número atômico 31, massa molar 69,72 e ponto de fusão 29,78 °C. Este mineral tem atraído a atenção de diversos pesquisadores por suas potenciais aplicações ao tratamento de doenças, tais como distúrbios na reabsorção óssea, com ou sem níveis elevados de cálcio no plasma, doenças autoimunes, certos tipos de cânceres e doenças infecciosas (BERNSTEIN, 1998).

A atividade do gálio, que inibe a reabsorção óssea levou ao seu uso na clínica para o tratamento de hipercalcêmica, e para a supressão de osteólise e tratamento de dor associada à metástase óssea. O uso de gálio tem sido também sugerido para o tratamento de osteoporose. Gálio apresenta ainda atividade imunomoduladora, mostrando-se efetivo na supressão de artrite em modelos animais, sem, contudo, ter ação imunossupressora e ação citotóxica (HALL e CHAMBERS, 1990; DOMINGUES, 2011).

Teixeira (2012) esclarece que o gálio possui conhecida propriedade anabólica no tecido ósseo, especialmente onde ocorrem os processos de formação e remodelação. Observações clínicas sugerem que interfere na reabsorção óssea, reduzindo sua taxa de dissolução, pela inibição na atividade dos osteoclastos.

De acordo com Melnikov, 2008 a situação clínica associada com uma maior perda de cálcio do tecido ósseo é a hipercalcemia relacionada com câncer. Nesta desordem fatores procedentes das células cancerígenas provocam um marcante aumento na absorção óssea pelos osteoclastos. O cálcio sai do osso tão rapidamente que sobrecarrega a capacidade excretora renal. Foi sugerido que baixas doses de nitrato de gálio poderão ser usadas na prevenção de osteólise em mieloma múltiplo.

Segundo Verron, (2010) o gálio demonstrou-se eficaz no tratamento de doenças associadas com a perda óssea acelerada, incluindo hipercalcemia relacionada com o câncer e doença de Paget. Estas aplicações clínicas sugerem que gálio pode reduzir a reabsorção do osso. Entretanto, poucos estudos têm relacionado os efeitos deste mineral em reabsorções osteoclásticas.

Além de atuar diretamente sobre os osteoclastos, o gálio pode, com base em evidências experimentais, inibir a formação e reabsorção óssea estimulada através

da ação sobre os osteoblastos. Evidências de estudos *in vivo* para melhora da formação óssea sugerem que é devido à formação óssea acentuada e aumento do teor de cálcio do osso em ratos tratados com nitrato de gálio (BERNSTEIN, 1998).

Bockman et. al. em 1990, afirmam que o gálio tem demonstrado eficácia no tratamento de diversas doenças, tendo com principal efeito a capacidade de suprimir a reabsorção óssea e conseqüentemente elevar os níveis de cálcio no sangue, além de possuir atividade inibitória nas reabsorções ósseas pela ação nos osteoclastos e sua característica de estimular os osteoblastos, favorecendo a neoformação óssea.

Com esforços de muitos laboratórios e pesquisadores têm acumulado evidências de que o gálio pode ter acentuada participação no metabolismo ósseo. Apesar de consideráveis avanços, ainda mais deve ser esclarecido. Aprimorar os conhecimentos dos mecanismos envolvidos pode fornecer ideias para estratégias terapêuticas, com o intuito de evitar perda óssea em ortopedia, traumatologia e condições patológicas relacionadas com doenças oncológicas. É esperado também o desenvolvimento de ensaios de triagem para testes clínicos de novos compostos do gálio (Melnikov, 2008).

2.3 Zinco

O zinco é um dos minerais mais comuns encontrados na terra, podendo ser encontrado no ar, solo, água e naturalmente em alimentos. É altamente utilizado na indústria farmacológica (óxido de zinco), bloqueadores solares, desodorantes, medicamentos para tratamento de micoses, acne e xampus anti-caspa, tendo ampla utilização em áreas odontológicas, médicas e domésticas (FILIU, 2010).

Este elemento, pertencente ao segundo grupo da Tabela Periódica, composto por elementos de transição e é um metal branco-azulado brilhante, estável ao ar, sendo recoberto por um revestimento branco de carbonato básico quando exposto a umidade. Apresenta ponto de fusão de 419,5° C e de ebulição de 908°C. Quando aquecido a 100-150°C, torna-se maleável, a 210°C torna-se quebradiço e pulverizável. Ao ser queimado no ar, gera chama verde azulada. Possui símbolo Zn, massa molecular de 65,38, e quando se encontra em pó é explosivo (OVESEN, 2001).

O efeito estimulatório do zinco na formação óssea tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo*. Além de estimular a proliferação e diferenciação de células osteoblasticas, o zinco promove um efeito inibitório na reabsorção óssea, especificamente na formação das células precursoras de osteoclastos na medula óssea (FERREIRA, 2010).

O zinco desempenha diversas funções no organismo humano, tais como a síntese proteica, metabolismo de DNA e RNA, metabolismo de carboidratos e lipídeos, metabolismo energético. Porém, sua principal função está na sua atuação enzimática, seja na estrutura da enzima ou em sua ação reguladora ou catalítica (OVESEN, 2001).

Estudos de McGray (1972) revelaram que, através de exames histológicos, os grupos que receberam doses de sulfato de zinco obtiveram um estágio avançado de cicatrização óssea do que o grupo controle em todos os intervalos de tempo. Sendo que esta aceleração foi maior nas fases iniciais do tratamento.

O papel do zinco no controle do metabolismo ósseo tem sido associado ao aumento da atividade da aminoacil-RNA transportador sintetase nos osteoblastos, a qual está envolvida no primeiro passo da biossíntese proteica. Dentre as proteínas que apresentam a sua síntese aumentada tem-se a osteocalcina. Estes fatores de crescimento agem recrutando células pré-osteoblasticas, derivadas das células estromais da medula óssea, induzindo à diferenciação e maturação destas em osteoblastos maduros, os quais serão capazes de sintetizar colágeno em grande quantidade. Acredita-se ainda que os osteoclastos ao reabsorver a matriz óssea liberam fatores como IGF-I, IGF-II e TGF-beta, os quais inibem futuras atividades osteoclásticas e estimulam a produção e atividade localizadas dos osteoblastos (FERREIRA, 2010).

O zinco forma um complexo funcional chamado “dedos de zinco”, uma estrutura com coordenação tetraédrica, que apresenta atividades em vários processos celulares como, replicação, reparo, proliferação e apoptose. Esses “dedos de zinco” atuam como moldes e se ligam a várias proteínas e moléculas de ácido nucleico (Figura 1).

Esse complexo de coordenação tetraédrica apresenta o átomo de zinco no sítio central do tetraedro, ligando com 4 cisteínas ou 3 cisteínas e 1 histidina ou 2 cisteínas e 2 histidinas. As arestas desse tetraedro serão determinadas pela natureza dos aminoácidos ligados, uma vez que podem formar um poliedro regular,

quando as arestas forem equidistantes, ou distorcidas, quando apresentam diferentes aminoácidos em sua composição. O tamanho das arestas serve como marca-passo para produzir uma determinada sequência de aminoácidos, isso demonstra o controle do zinco nas atividades enzimáticas e no processo de proliferação das células e no crescimento celular (MILLS, 1989).

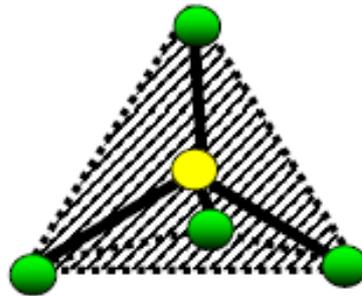


Figura 1 - Coordenação tetraédrica com átomo de zinco na posição central.

2.4 Microtomografia de Raio-X Computadorizada

A microtomografia por raios-X realizada pelo microtomógrafo de raios-X de alta resolução (μ CT) é uma técnica que permite a visualização de seções transversais de um objeto de forma não destrutiva, através de um conjunto de projeções do plano e com o auxílio de um computador com um programa de reconstrução de imagens. A tomografia computadorizada por transmissão foi desenvolvida por Godfrey N. Hounsfield em 1972, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina em 1979 (HOUNSFIELD, 1973).

A análise da microestrutura do osso, incluindo a rede de canais, tem sido largamente restrita ao domínio bidimensional. Ainda que os métodos histomorfométricos 2D continuam a fornecer uma ampla variedade de informações sobre a dinâmica do tecido ósseo, eles não podem produzir uma imagem completa da microestrutura tridimensional do osso cortical (VERONESI, 2009).

Milanetti (2011) afirma que a microtomografia por raios-x, proporciona medidas quantitativas e tridimensionais da estrutura e mineralização do calo ósseo e essas medidas podem estar relacionadas a rigidez e resistência mecânica do calo.

Além de quantificar as estruturas ósseas permite analisar a remodelação, mineralização, volume e microarquitetura do tecido (BATISTA, 2010).

Neste processo, os raios X são emitidos em um feixe estreito que passa por uma pequena parte do objeto, sendo detectado do outro lado da amostra. A intensidade dos raios X que chega ao detector de diferentes ângulos é convertida em um sinal digital, posteriormente processado por um computador e convertido em uma imagem espacial de alta resolução (CARVALHO, 2013).

Esta técnica implica a tomada de imagens de projeção radiográficas de um objeto a partir de vários ângulos ao redor deste, e matematicamente converte estas imagens em um conjunto de fatias de imagem de secção transversal, o que representa uma imagem Tridimensional (3D). Estas imagens de projeção são obtidas ao longo de um total de rotação de 180 ou 360 graus. Enquanto as projeções de imagens individuais de raios-X são imagens Bidimensionais (2D) , a rotação da amostra visualizada em relação à fonte de raios-X e de câmara permite a localização precisa em 3D dos objetos a serem analisados para assim se confeccionar cálculos(LABRINIDIS, 2008).

Assim, as medidas do perímetro do osso podem ser convertidas para uma estimativa da área da superfície, de secção transversal e convertidos para uma estimativa do volume de ósseo e perímetro medindo a razão de área fornece a base para as estimativas de espessura trabecular óssea (INTROINI, 2011).

Segundo Silva *et. al.* (2004), a compreensão das propriedades macroscópicas de estruturas biológicas, tais como a estrutura óssea, e de sua estrutura microscópica é de grande interesse na caracterização da qualidade óssea.

Para Goldstein *et. al.* (1983), a densidade do osso trabecular foi relacionada à sua resistência e rigidez. Apesar das medidas de densidade frequentemente levarem a estimativas razoáveis das propriedades mecânicas, elas não explicam certas variações observadas nestas propriedades, não são influenciadas pela microestrutura do osso trabecular, representando assim uma medida escalar incompleta para a previsão das propriedades mecânicas. Duas amostras ósseas com frações de volume ($BV/TV = \text{Volume de Tecido Ósseo/Volume}$) próximas entre si de 18% e 19%, respectivamente, apresentaram propriedades mecânicas que variaram de 30% a uma ordem de magnitude, dependendo da direção analisada.

Os cálculos são realizados somente sobre a região em razão ao volume da região selecionada. A seleção precisa das regiões ou volumes de interesse é de

fundamental importância para a obtenção de dados precisos e significativos. O termo "região de interesse", ou VOI, refere-se a uma região selecionada de uma única imagem de secção transversal (LABRINIDIS, 2008).

Veronesi *et. al.* 2009 determina que os parâmetros mais interessantes para análise morfométrica tridimensional, são densidade média (DM), volume ósseo (BV), volume de tecido (TV), a relação entre o volume ósseo e volume de tecido (BV / TV), superfície óssea (BS), densidade de superfície óssea (BS / TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.N).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a suplementação de zinco e gálio para reparação de defeitos ósseos em rato.

3.2 Específicos

Verificar o caráter da cicatrização em função do tempo de pós-operatório.

Avaliar as técnicas experimentais escolhidas.

Caracterizar a capacidade de detecção do reparo ósseo através da microtomografia de raios-x.

Quantificar a densidade óssea, comparando os grupos tratados e não tratado aos 21 e 28 dias de observação.

Quantificar o volume ósseo e volume tecidual, bem como a sua relação, comparando os grupos tratados e não tratado aos 21 e 28 dias de observação.

Quantificar o número e a espessura das trabéculas ósseas neoformadas, comparando os grupos tratados e não tratado aos 21 e 28 dias de observação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste experimento foi devidamente encaminhado ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aprovado sob o número 471/2012 (Anexo 1).

4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 36 animais da linhagem Wistar albino (*Rattus norvegicus*), machos adultos, com idade aproximada de três meses, e peso de 260 a 350 gramas, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, e subdivididos conforme o tempo de observação, 21 e 28 dias após a realização do defeito ósseo (Figura 02).

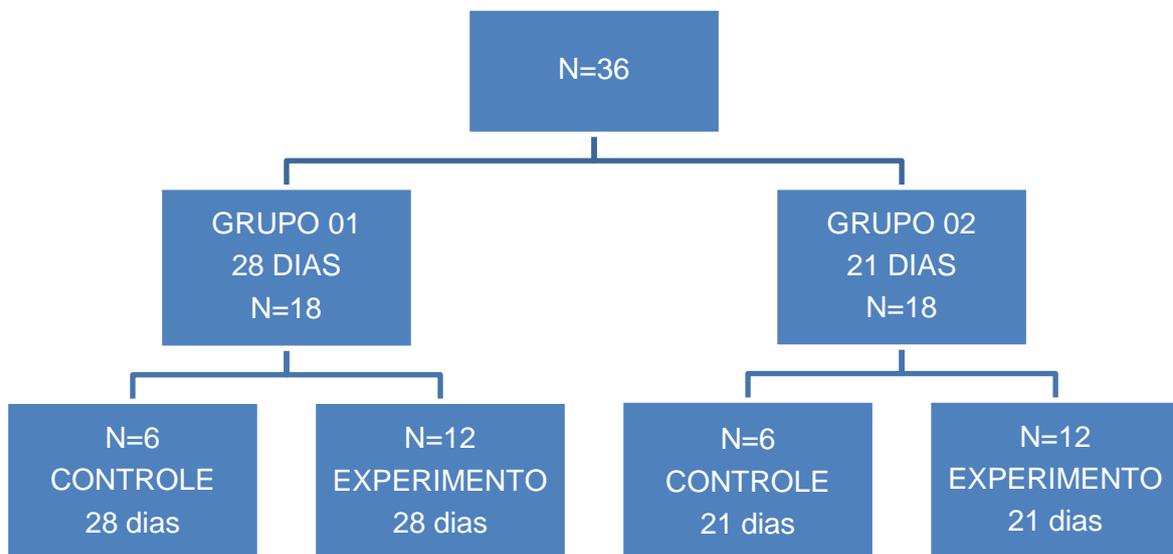


Figura 2 - Organograma da distribuição dos animais nos grupos, conforme tratamento e tempo de observação do reparo ósseo.

Durante todo o processo experimental os animais foram mantidos com dieta à vontade, e alojados em caixas apropriadas para a espécie, com forragem de maravalha que foi substituída regularmente.

4.2 Procedimento Cirúrgico

O plano anestésico foi induzido com Cetamin® (cloridato de cetamina) Syntec na dose de 0,25 mg/100g administrado por via intraperitoneal em associação com Rumpum® (cloridato de xilazina) Bayer dose de 0,1 a 0,3 mg/100g, sendo calculada individualmente conforme o peso de cada animal .

Sob técnica asséptica, foi realizada incisão da pele, na face crânio-medial da tíbia, de aproximadamente 2 cm, para confecção do defeito ósseo.

Após o acesso ao osso, foi realizado o processo de perfuração do mesmo com uma Microretífica DREMEL® 3000 com 120 W a 33000 rotações por minuto, equipada com broca DREMEL® modelo 191 com 3,2 mm (1/8"). O defeito ósseo produzido estendia-se do perióstio até o canal medular, ambos os membros foram operados na mesma sequência (Figura 3).



Figura 3 - Procedimento cirúrgico – a) tricotomia e assepsia do local da incisão; b) defeito ósseo do membro esquerdo; c) defeito ósseo do membro direito; sutura simples de incisão.

Após confecção do defeito, sendo certificado o controle hemostático, realizou-se sutura simples na pele, os animais ficaram em observação por um período de doze horas, sendo neste intervalo administrado 0,1ml/animal de anti-inflamatório (Flunixinina – Meglunina, Banamine®, Shering-Plough) via intramuscular.

As radiografias foram realizadas no Hospital Veterinário da UFMS, primeiramente na recuperação dos animais do plano anestésico, e após o procedimento de eutanásia.

4.3 Procedimentos: Administração da Suspensão

O zinco em associação com o Gálio foi administrado na forma de solução de quelato de Zn, na concentração de 100mg/100ml de ambos os minerais, por via oral com uma Sonda de Gavagem de fabricação artesanal, sendo esta uma agulha 1,60 x 40 mm (16G) com canhão de fundo branco BD™, devidamente polida e com curvatura adequada para o procedimento, não houve problemas na administração das soluções no que diz respeito à ingestão dos produtos.

A dose foi calculada em 0,1ml/100g/dia, e administrada durante 07 dias, no período vespertino. Em todos os casos, sem exceção, a suplementação foi iniciada um dia após o procedimento cirúrgico. Visando garantir a qualidade do produto, o composto foi manipulado por uma farmácia especializada (Pharmaceutica) e a adição de Gálio foi realizada no Laboratório de Metabolismo Mineral da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

O certificado de análise do produto foi fornecido pelo laboratório Pharma Nostra (unidade ANÁPOLIS) realizado no dia 10/07/2013 (Anexo 2). O produto não possuía sabor nem açúcar (TAST-FREE).

4.4 Eutanásia dos Animais

Todos os grupos foram submetidos à eutanásia por dose letal de 100mg/kg de tiopental sódico, via intraperitoneal. Constatado o óbito, removeram-se os membros que sofreram o procedimento e estes foram acondicionados individualmente em recipientes, devidamente identificados, com formol tamponado a 10%, que posteriormente foi substituído por solução alcoólica 70%.

4.5 Análise Morfológica

A análise morfológica foi feita por Microtomografia de raios-X do osso do rato por um aparelho Skyscan 1076, equipado com uma câmera de 1.3MP usada para capturar imagens de cada passo de rotação entre cada fotograma de 0,45 ° e um feixe de 60kV e 100µA ampliada para 5µm/pixel. Foi utilizado para reduzir o endurecimento do feixe um filtro de 1 mm de espessura, tendo um tempo de exposição de 4.7s, o passo de rotação de 0,8 °, com uma rotação completa sobre 197 °, resultando em um tempo de varredura aproximado de 20 minutos por peça.

Usando Software CT Analyser, cortes sucessivos em bidimensão foram transformados em imagens tridimensionais para quantificar densidade média (DM) em porcentagem, volume ósseo (BV) com valores milímetros cúbicos, volume de tecido (TV) em milímetros cúbicos e relação entre volume ósseo e volume de tecido (BV / TV) expressa em porcentagem, espessura trabecular (Tb.Th) em milímetros e número de trabéculas (Tb.N) em quantidade de trabéculas por milímetro quadrado, na região de interesse, o qual foi identificado como sendo a área correspondente ao calo ósseo.

4.6 Análise Estatística

Foram calculadas as médias e desvios padrões de cada grupo, utilizando os métodos estáticos de ANOVA para avaliar afirmações sobre as médias de

populações e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes. Verificando as variações, para posterior confronto dos dados, determinado as diferenças entre os grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo de defeito ósseo produzido no presente trabalho, com 3,2 mm (1/8"), do periósteo até o canal medular em ambas as tíbias, permitiu análise morfológica tanto por radiografia simples (figura 4), como por microtomografia de Rx. De acordo com Domingues (2011), defeitos ósseos com 1,5 mm de espessura, aos 30 dias obtiveram total reparo enquanto que Almeida (2006) em seu modelo com 3 mm afirma que aos 30 e 45 dias, o reparo é ainda parcial. Piai (2005), confeccionou defeitos ósseos em tíbias de ratos machos, com broca trefina de 3,0mm de diâmetro. Decorrido um período de 28 dias, houve preenchimento de toda a extensão superficial e profunda do defeito, por tecido ósseo maduro. Milanetti, (2011), observou que animais aos 21 dias de pós-cirúrgico tiveram consolidação completa após realização de um defeito com 1,2 mm de diâmetro na porção medial do fêmur utilizando uma broca odontológica.

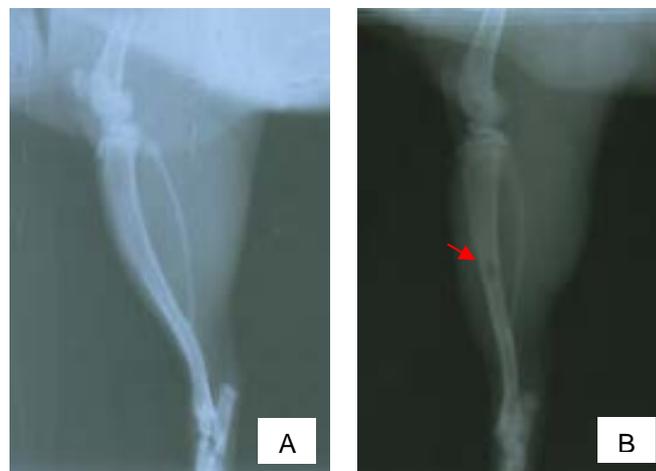


Figura 4 - Radiografia Mediolateral e Caudocranial representando o grupo controle 28 dias, estruturas osteoarticulares sem alterações (A) e grupo controle 21 dias, com evidente ponto radiotransparente em região medial de tibia – túnel cirúrgico (B).



Figura 5 - Radiografia Mediolateral e Caudocranial representando o grupo experimento 28 dias, Estruturas osteoarticulares sem alterações (A) e grupo controle 28 dias, ténue forma circular radiotransparente em região medial de tibia – túnel cirúrgico (B).

Na figura 5, pode-se observar que os animais do grupo 28 dias já apresentavam fechamento total da área do defeito, fato também observado no trabalho de Almeida e colaboradores (2006), que afirmam que tamanho intermediário e período de tempo menor são os mais indicados para se analisar defeitos ósseos.

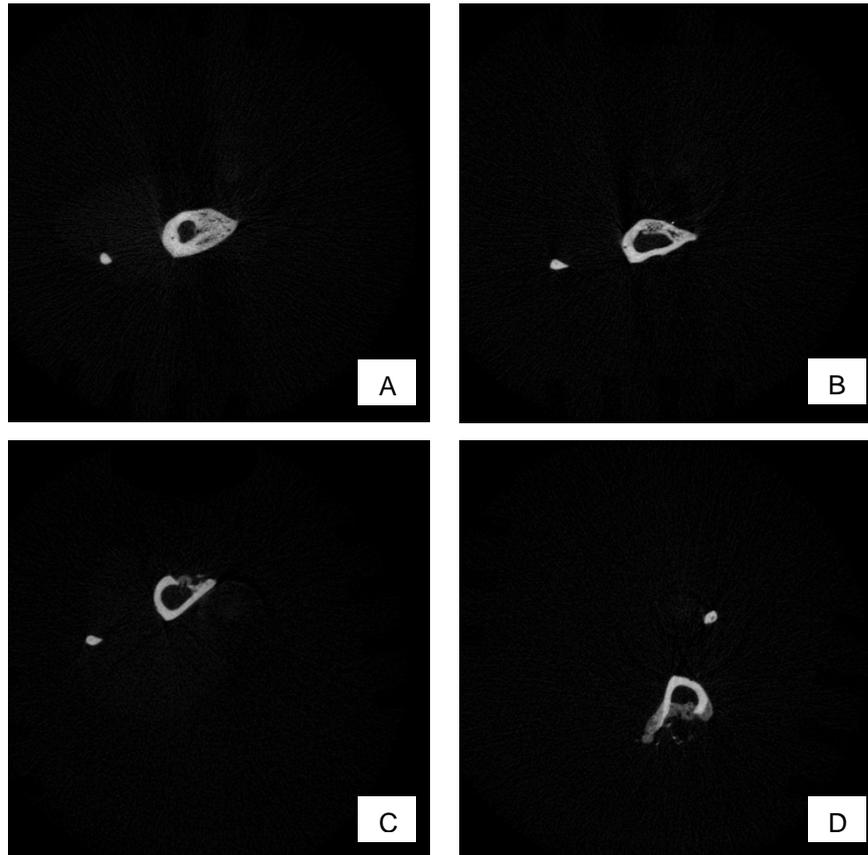


Figura 6 - Imagens geradas pela análise da microtomografia computadorizada nos grupos controle aos 21(A) e 28 dias (B) e tratamento 21(C) e 28 dias (D).

Foi observado que a administração de nitrato de gálio em associação com quelato de zinco não apresentou interferência no processo de cicatrização óssea de ratos, devido às diferenças do período de análise no qual seria apropriado um tempo de observação menor para o grupo controle e experimento 21 dias.

Domingues (2011) em um experimento envolvendo mineral trióxido agregado associado ao nitrato de gálio e vidrobioativo, observou que em animais com 30 dias de defeito, já não era possível identificar o sitio da lesão, sendo considerado totalmente reparado, porém o tamanho do defeito utilizado era de apenas 1,5 mm de espessura e profundidade. Isso evidência que um período de tempo menor de análise pode sim ser realizado, desde que o animal tenha sido medicado com suplementação de suporte à base de zinco e gálio que iria acelerar o processo de cicatrização.

A dose utilizada no experimento foi de 100 mg da solução contendo nitrato de gálio e quelato de zinco para cada 100 gramas de peso vivo de cada animal com uma dose aproximada de 0,3 ml por rato tratado. Ocorreu um quadro de intoxicação

levando os animais a apresentarem diarreia, hipotermia, apatia e anorexia, podendo ter ocorrido um fenômeno denominado efeito reverso, na qual o gasto do organismo em absorver e eliminar o excesso desses minerais pode ter ocasionado desgaste nutricional.

Porém, Ovesen e colaboradores (2001) em um estudo sobre o metabolismo ósseo, administraram 60 mg de Zinco para cada 500 gramas de peso corpóreo e esta dose resultou em aumento da resistência e comprimento femoral, melhorando também os índices de crescimento e aumento do peso corpóreo de ratos. Um trabalho de Hall e Chambers (1990), envolvendo o nitrato de gálio administrado na dose variando entre 0,1 a 100 mg / ml produziu uma relação dose dependente da reabsorção óssea pelos osteoclastos isolados a partir de ossos longos oriundos de ratos jovens.

Outro estudo que incluía a suplementação com zinco, de Ferreira *et. al.* (2007), demonstrou que baixas doses (5,5 mg ao dia) pode influenciar positivamente a recuperação do volume ósseo e trabecular, mas novos estudos deveriam ser realizados afim de padronizar as doses tanto de gálio quando de zinco.

Bockman e colaboradores, em 1995, administraram doses 0,05; 0,25 e 0,5 mg de nitrato de gálio por quilo em 49 pacientes com doença de Paget por 14 dias, concluindo então que o gálio foi capaz de iniciar uma recuperação nos parâmetros de reabsorção óssea, e suprimindo assim a atividade da doença.

McCray (1972) em estudos utilizando zinco demonstrou que este é gerado em tecidos de cicatrização, em um período de tempo entre 5 a 7 dias após a lesão. Esses níveis podem ser atribuídos aos picos que ocorrem em momentos específicos podendo ser associados com a atuação de algumas enzimas particulares. Sendo relatado que no sexto dia de tratamento há interferência, aumentando a formação de colágeno no local da ferida.

Os valores da média, desvio padrão, valores máximo e mínimo estão apresentados na Tabela 1, conforme os parâmetros da densidade óssea, volume ósseo, volume do tecido, relação volume ósseo com volume do tecido e espessura trabecular e número de trabéculas.

Tabela 1 - Avaliação dos parâmetros microtomográficos dos grupos controle e experimento, nos períodos de 21 e 28 dias.

Grupo	Controle		Experimento	
	21 Dias	28 Dias	21 Dias	28 Dias
Densidade óssea				
Media \pm DP	0,83 \pm 0,06	0,84 \pm 0,04	0,84 \pm 0,02	0,88 \pm 0,02
Máximo	0,90	0,90	0,88	0,92
Mínimo	0,78	0,79	0,82	0,86
Volume ósseo				
Media \pm DP	1,65 \pm 1,42	4,14 \pm 2,54	1,14 \pm 0,65	4,94 \pm 1,25
Máximo	3,81	7,88	1,99	6,90
Mínimo	0,32	1,61	0,39	3,89
Volume tecido				
Media \pm DP	4,77 \pm 2,22	8,02 \pm 3,6	5,19 \pm 2,89	8,14 \pm 2,20
Máximo	6,74	13,06	10,56	11,62
Mínimo	1,33	3,15	2,47	6,21
Relação volume ósseo e volume do tecido				
Media \pm DP	31,36 \pm 17,10	49,71 \pm 11,27	23,17 \pm 10,07	59,06 \pm 5,91
Máximo	56,56	60,36	36,81	66,37
Mínimo	8,44	34,02	10,82	49,05
Espessura trabecular				
Media \pm DP	0,25 \pm 0,11	0,37 \pm 0,09	0,21 \pm 0,07	0,43 \pm 0,06
Máximo	0,43	0,45	0,33	0,51
Mínimo	0,12	0,24	0,12	0,34
Número de trabéculas				
Media \pm DP	1,12 \pm 0,32	1,33 \pm 0,08	1,05 \pm 0,33	1,35 \pm 0,22
Máximo	1,47	1,42	1,55	1,73
Mínimo	0,66	1,19	0,57	1,08

No presente estudo, os valores referentes à densidade média, volume ósseo, volume de tecido, relação entre volume ósseo e volume de tecido e a espessura e volume de trabéculas não apresentaram uma diferença estatística significativa, Carvalho e colaboradores (2013), ao analisar os valores desses parâmetros em ratos, concluíram que estes dados relacionam-se positivamente quando o indivíduo mantém suas características fisiológicas preservadas.

Com relação ao parâmetro Densidade Óssea, o grupo controle de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $0,83 \pm 0,06$ e $0,84 \pm 0,04$, respectivamente. No grupo tratamento de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $0,84 \pm 0,02$ e $0,88 \pm 0,02$, respectivamente, como pode ser observado no Gráfico 1.

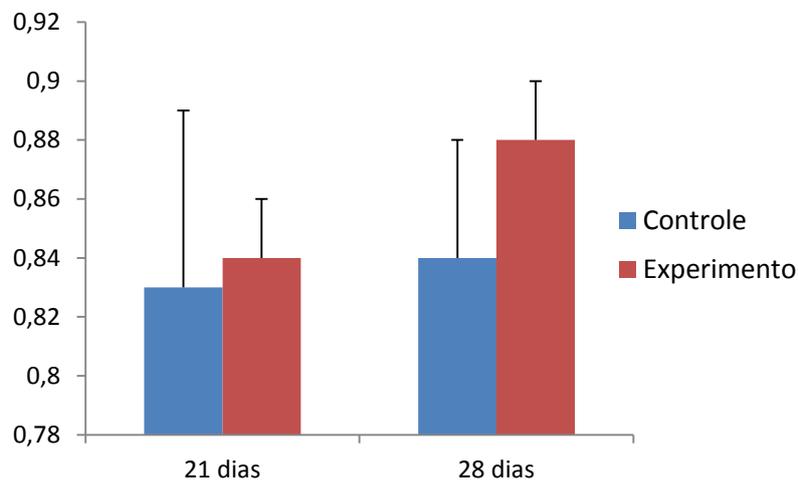


Gráfico 1 - Densidade óssea dos grupos controle e experimento.

Introini (2011) ao analisar efeitos do uso de ultrassom em fêmures de ratos obteve os resultados das densidades médias de cada grupo sendo que em animais tratados o valor foi 0.26 e de 0.28 em ratos que não receberam interferências aos 14 dias do experimento.

Os dados apresentados pelo Volume Ósseo em mm^3 , no grupo controle de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $1,65 \pm 1,42$ e $4,14 \pm 2,54$, respectivamente. No grupo tratamento de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $1,14 \pm 0,65$ e $4,94 \pm 1,25$, respectivamente, como pode ser observado no Gráfico 2.

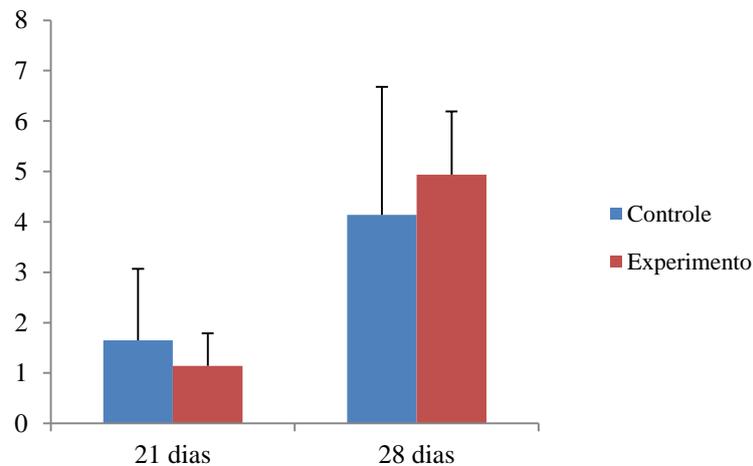


Gráfico 2 - Volume ósseo do grupo controle e experimento.

Leigh (2010) em um estudo defeitos ósseos de calvária em ratos influenciados pela suplementação de zinco em diferentes concentrações e concluiu que animais tratados com 20 mg/kg, 60 mg/kg e 120 mg/kg aos quatro meses pós-cirurgia apresentaram valores médios e desvio padrão de volume ósseo 14.24 ± 6.09 , 14.29 ± 11.55 e 23.81 ± 12.97 no grupo controle, 37.07 ± 21.21 , 51.19 ± 17.31 e 34.83 ± 23.98 em animais tratados com fragmentos ósseos em associações com zinco e 119.82 ± 24.34 , 90.13 ± 19.98 e 114.06 ± 12.84 em ratos tratado com matriz óssea bovina desmineralizada e zinco, respectivamente.

Introini (2011) ao analisar efeitos do uso de ultrassom em fêmures de ratos encontrou valores médios de volume ósseo em animais tratados de 1.35 e 0.9 em ratos que não receberam interferências aos 14 dias do experimento.

Com o valor referente ao Volume do Tecido, o grupo controle de 21 e 28 dias, os valores médios em mm^3 foram de $4,77 \pm 2,22$ e $8,02 \pm 3,06$, respectivamente. No grupo tratamento de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $5,19 \pm 2,89$ e $8,44 \pm 2,20$, respectivamente, como pode ser observado no Gráfico 3.

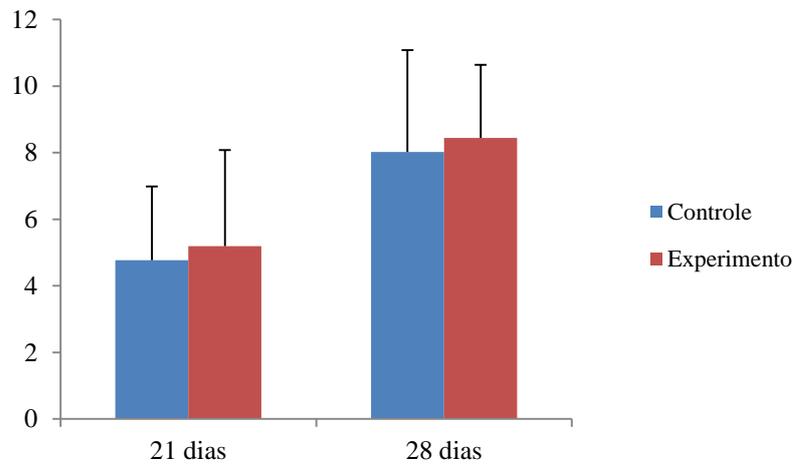


Gráfico 3 - Volume do Tecido dos grupos controle e experimento.

Introini (2011) estudando os efeitos da ultrassonografia observou os valores médios de volume de tecido em animais tratados de $2,58 \text{ mm}^3$ e em ratos que não receberam interferências o valor foi $1,77 \text{ mm}^3$ aos 14 dias do experimento em fêmures de ratos.

As relações entre o Volume ósseo e o Volume do tecido, expressos em porcentagem, apresentaram no grupo controle de 21 e 28 dias, os valores médios forma de $31,36 \pm 17,10$ e $49,71 \pm 11,27$ respectivamente. No grupo tratamento de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $23,17 \pm 10,07$ e $59,06 \pm 5,91$, respectivamente, no Gráfico 4.

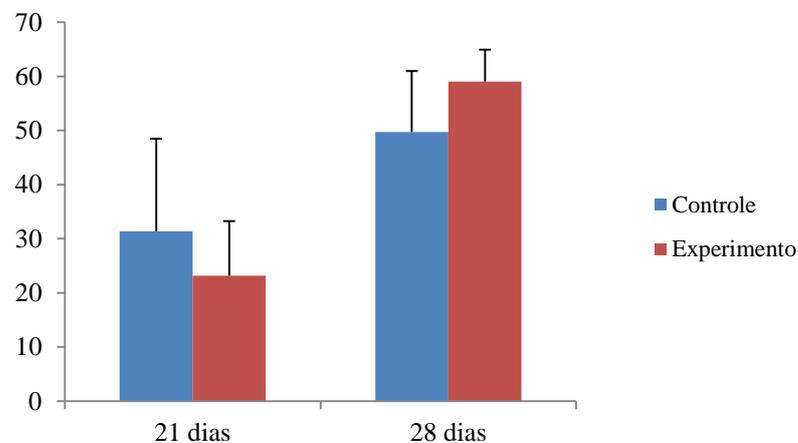


Gráfico 4 - Relação volume ósseo e volume de tecido dos grupos controle e experimento.

Leigh (2010) em um estudo sobre suplementação de zinco em diferentes concentrações em defeitos ósseos de calvária em ratos concluiu que animais tratados com 20 mg/kg, 60 mg/kg e 120 mg/kg aos quatro meses pós-cirurgia apresentaram valores médios e desvio padrão da relação volume ósseo e volume de tecido, foi de 25.98 ± 15.35 , 27.57 ± 10.61 e 47.60 ± 15.28 no grupo controle, 46.79 ± 16.33 , 36.66 ± 10.37 e 34.83 ± 23.98 em animais tratados com fragmentos ósseos em associações com zinco e $46.45 \pm 10,02$, 55.08 ± 8.99 e 56.53 ± 7.77 em ratos tratado com matriz óssea bovina desmineralizada e zinco, respectivamente.

Batista (2010) realizou um estudo na qual avalia os efeitos da cicatrização óssea em ratos com sobrecarga de cálcio e fosforo, após sofrerem nefrectomia do rim direito, e por um período de observação de 52 dias, obtendo os valores de relação entre volume ósseo e volume de tecido expresso em porcentagem de, 19.39 ± 2.0 , 13.16 ± 1.5 e 11.84 ± 1.5 . Em animais controle, suplementados apenas com cálcio e suplementação de cálcio em associação com fosforo, respectivamente.

Introini (2011) ao analisar efeitos do uso de ultrassom em fêmures de ratos encontrou valores médio das relações volume ósseo e volume de tecido em animais tratados de 52.49 e 50.64 em animais que não receberam interferências aos 14 dias do experimento.

Com relação ao parâmetro Espessura Trabecular, o grupo controle de 21 e 28 dias, os valores médios em mm foram de $0,25 \pm 0,11$ e $0,37 \pm 0,09$, respectivamente. No grupo tratamento de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $0,21 \pm 0,07$ e $0,43 \pm 0,06$ respectivamente, no Gráfico 5.

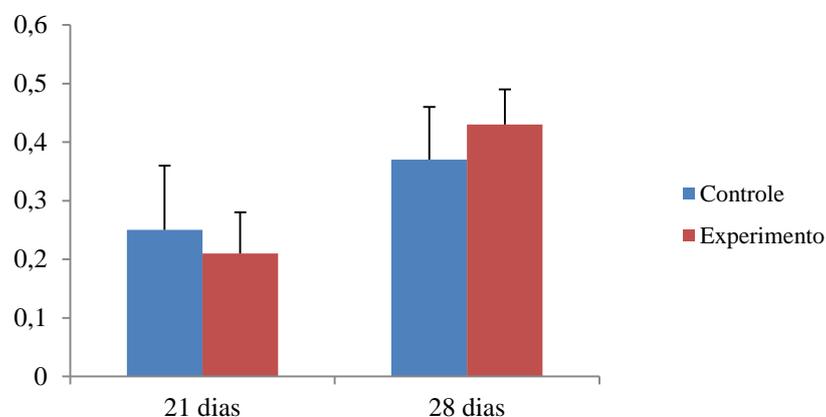


Gráfico 5 - Espessura Trabecular dos grupos controle e experimento.

Batista (2010) estudou efeitos da cicatrização óssea em ratos com sobrecarga de cálcio e fosforo, após sofrerem nefrectomia do rim direito, e por um período de observação de 52 dias, obtendo os valores de espessura trabecular, $0,07066 \pm 0,0043$, $0,05836 \pm 0,0028$ e $0,0615 \pm 0,0045$. Em animais controle, suplementados apenas com cálcio e suplementação de cálcio em associação com fosforo, respectivamente.

Tendo como parâmetro os valores dos Números de Trabéculas, o grupo controle de 21 e 28 dias, os valores médios forma de $1,12 \pm 0,32$ e $1,33 \pm 0,08$, respectivamente. No grupo tratamento de 21 e 28 dias, os valores médios foram de $1,05 \pm 0,33$ e $1,35 \pm 0,22$, respectivamente no Gráfico 6.

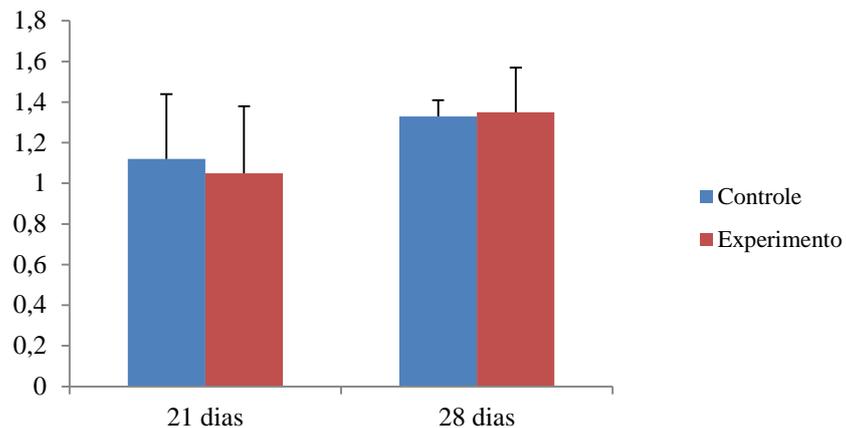


Gráfico 6 - Números de Trabéculas dos grupos controle e experimento.

Uma pesquisa de Batista (2010) na qual avalia os efeitos da cicatrização óssea em ratos com sobrecarga de cálcio e fosforo, após sofrerem nefrectomia do rim direito, e por um período de observação de 52 dias, obtendo os valores de número de trabéculas, $2,72 \pm 0,18$, $2,23 \pm 0,21$ e $2,18 \pm 0,28$. Em animais controle, suplementados apenas com cálcio e suplementação de cálcio em associação com fosforo, respectivamente.

A soma de todos os grupos de 21 e 28 dias, ambos de controle e experimento, pode-se notar, na Tabela 2, que a variável tempo teve relação positiva nos parâmetros volume do tecido, volume ósseo e consequentemente relação volume ósseo e volume do tecido, espessura e número de trabéculas, fato observado pela maior tempo de recuperação dos animais.

Tabela 2 - Valores médios dos parâmetros da microtomografia, nos períodos de 21 e 28 dias conforme resultados da somatória de todos os animais no MCT análise.

	Densidade média	Volume do tecido	Volume ósseo	Volume ósseo / volume do tecido	Espessura trabecular	Número de trabéculas
21 dias	0,83a	4,98a	1,40a	27,27a	0,23a	1,08a
28 dias	0,86a	8,23b	4,54b	54,40b	0,40b	1,34b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, no nível de 5% de confiança pelo teste T.

Somando-se todos os grupos controle e experimento, ambos de 21 e 28 dias, respectivamente, podemos observar (Tabela 3) que os animais dos grupos experimento e controle, não apresentaram diferença estatística significativa entre a administração ou não da suspensão de quelato de zinco e nitrato de gálio.

Tabela 3 - Valores médios dos parâmetros da microtomografia, nos grps controle e experimento, conforme resultados da somatória de todos os animais no MCT análise.

	Densidade média	Volume do tecido	Volume ósseo	Volume ósseo / volume do tecido	Espessura trabecular	Número de trabéculas
Controle	0,83a	6,39a	2,89a	40,55a	0,31a	1,22a
Experimento	0,86a	6,81a	3,04a	41,11a	0,32a	1,20a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, no nível de 5% de confiança pelo teste T.

6 CONCLUSÃO

A reparação óssea se mostrou presente tanto radiograficamente, quanto nas imagens por microtomografia, em graus variáveis de acordo com o tempo de pós-operatório, mostrando uma correlação positiva.

A técnica do microtomógrafo de raios-x, mostrou-se como um método promissor para avaliar a reparação óssea em modelos experimentais.

O procedimento de microtomografia de raios-x não permite detectar satisfatoriamente o quadro do reparo ósseo em rato.

A recuperação da densidade óssea nos animais tratados com gálio e zinco foi mais avançada que no grupo controle.

Os valores de volume ósseo e volume de tecido não se mostraram significativos na recuperação dos defeitos ósseos.

Os parâmetros, relação entre volume ósseo e volume de tecido, espessura e número de trabéculas, serem maiores no grupo tratado, justifica seu uso como marcadores do processo reparatório.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P.F; de ANBINDER, A.L.; JAIME, A.P.G.; LIMA, A.P.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R.F da. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, São Paulo, ano 7, n. 12, p. 51-56, 2006.

BATISTA, D.G. *Dieta com sobrecarga de Cálcio e Fósforo leva a diminuição do volume ósseo de ratos urêmicos*. 2010, 44 f. Tese (Programa de Nefrologia) Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BERNSTEIN, L.R. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharm Reviews*, n. 50, p. 665-72, 1998.

BOCKMAN, R.S.; REPO, M.A.; WARREL, R.P. Distribution of trace levels of therapeutic gallium in bone as mapped by synchrotron x-ray microscopy. *Proc Natl Acad Sci*, n. 87, p. 4149-53, 1990.

CARVALHO, G.; PESSÔA, J.R.C.; VIDAL, F.V.; ASSIS, J.T. Morfologia da estrutura interna de ossos: microtomografia por raio x, *Littera*, Rio de Janeiro, ano 1, n. 2, p 3-8, 2013.

DOMINGUES, F.H.F. *Avaliação da biocompatibilidade e capacidade osteoindutoras do mineral trióxido agregado modificado por vidro bioativo ou nitrato de gálio*. 2011. 92 f. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2011.

FERREIRA, E.C.S. *Osteopenia diabética e pós-menopausa: efeito metabólico do zinco na recuperação do volume ósseo trabecular*. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Natal. 2010.

FILIÚ, W.F.O. *Perfil dos componentes minerais e protéicos no sangue da população indígena terena em mato grosso do sul*. 2010. 125 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2010.

GOLSDSTEIN, S. A.; WILSON, D.L.; SONSTEGARD, D.A.; MATTHEWS, L.S. The Mechanical properties of human trabecular bone as a function of metaphyseal location. **Journal of Biomechanics**, n. 16, p. 959 –969, 1983.

HALL TJ. CHAMBERS TJ. Gallium inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts. *Bone Miner*, n. 8, v. 3, p. 211-6, 1990.

HILDEBRAND, T.; LAIB, A.; MULLER, R.; DEQUEKER, J.; RUEGSEGGER, P. Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of Human Cancellous Bone: Microestrutural Data from Spine, Femur Iliac Crest and Calcaneus, *Journal of Bone and Mineral Research*, c. 14 – 7, p. 1167-1174, 1999.

HOUNSFIELD, G.N. Computadorizedtransverse axial scannig (tomography): part 1. Descriptionof system. *Br. J. Radiol*, n. 46, p. 1016-1022, 1973.

INTROINI, S.O. *Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo por Microtomografia Tridimensional por Raios-X*. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011.

LABRINIDIS, A.; DIAMOND, P.; MARTIN, S.; HAY, S.; LIAPIS, V.; SIMS, N.A.; ATKINS, G.J.; VINCENT, C.; FINDLAY, D.M.; ZANNETTINO, A.C.W.; EVDOKIOU, A. APO2L/trailinhibitstumourgrowthandbonedestruction in a murinemodelofmultiple. *SkyScanUser*, Austrália, p 1-5, 2008.

LEIGH, J.; THOMSEN, J.S.; BARLACH, J.; MOSEKILDE L.; MELSEN, B. No influence of alimentary zinc on the healing of calvarial defects filled with osteopromotive substances in rats. *European Journal of Orthodontics*, Denmark, n. 32, p. 124–130, 2010.

MCCRAY, L.A.; HIGA, L.H.; SONI, N.N. The effect of orally administered zinc sulfate on extraction wound healing in hamsters. *Oral Surgery*, Iowa, v. 33, n. 2. P. 314-322, 1972.

MARTINS, G. L. *Estudo Microscópico do Reparo Ósseo na Mandíbula de ratos Submetida à Osteotomias a fresa cirúrgica e laser de Er:YAG*. 2001. 118 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001.

MELNIKOV, P.; MALZAC, A.; COELHO, M. B. O gálio e a patologia óssea. *ActaOrtopedia Brasileira*. [periódico na Internet]. Campo Grande, n. 16, p. 54-57, 2008.

MILANETTI, M.R.; ALVES, J.M.; da SILVA, A.H.; INTROINI, S.O. Avaliação do reparo ósseo por microtomografia por raio-X. *Rev Med*, São Paulo, n. 90, v. 2, p.89-93, 2011.

MILLS, C.F. Zinc in Human biology. *Hum NutrVer*, Berlim: Springer-Verlag, 1989.

MOURA, F.N. *Síntese e Caracterização de Recobrimentos de Monetita e Hidroxiapatita Parcialmente Substituída com Zinco*. 2012. 105 f. Tese (Pós-graduação em Engenharia de Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro. 2012.

OVESEN, J.; MOLLER-MADSEN, B.; THOMSEN, J.S.; DANSCHER, G.; MOSEKILDE, L. The Positive Effects of Zinc n Skeletal Strength in Growing Rats.*Bone*, v. 29, n. 6, p. 565-570, 2001.

PIAI, C.R.; CARVALHO, V.A.P.; WERKMAN, C.; ANBINDER, A.L.; ROCHA, R.F. Effects of risedronate in bone repair of male and female rats with osteopenia. *Cienc Odontol Bras*, n. 8, v. 3, p. 77-82, 2005.

SANTOS, M.H. *Síntese e caracterização de biocompósitos fosfatos de cálcio/colágeno dopados com zinco*. 2005. 197 f. Tese (Pós-graduação em

Engenharia Metalúrgica e de Mina) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2005.

SASSIOTO, M.C.P.; INOUE, C.M.; AYDOS, R.D.; FIGUEIREDO, A.S.; PONTES, E.R.J.C.; TAKITA, L.C. Estudo Morfológico do Reparo de Defeito Ósseo com Diclofenaco Sódico e Calcitonina em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 19, n. 5, 2004.

SIQUEIRA Jr., J.F.; DANTAS, C.J.S. Reparação tecidual: aspectos biodinamicos. In: Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. *Medsa*, Rio de Janeiro, cap.17, p.197-225, 2000.

SILVA, A.M.H. *Análise Morfométrica 2D e 3d DE Amostras de Osso Trabecular Utilizando Microtomografia Tridimensional por Raios-X*. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

TEIXEIRA, A.L.R. *Síntese e estudo da hidroxiapatita e vanadatoapatita contendo gálio, para o uso na cirurgia ortopédica*. 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2012.

VERONESI, F.; SALAMANNA, F.; PARRILLI, A.; FINI, M.; GIARDINO, R. Micro-CT SKYScan 1172 potential in orthopaedic applications. *SkyScan User*, Itália, p. 39-42, 2009.

VERRON, E.; MASSON, M.; KHOSHNIAT, S.; DUPLOMB, L.; WITTRANT, Y.; BAUD'HUIN, M.; BADRAN, Z.; BUJOLI, B.; JANVIER, P.; SCIMECA, J.C.; JEAN-BOULER, M.; GUICHEUX, J. Gallium modulates osteoclastic bone resorption in vitro without affecting osteoblasts. *Br J Pharmacol*, n. 159, v. 8, p. 1681–1692, 2010.

8 ANEXOS



CERTIFICADO DE ANÁLISE

TESTES		ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Pág 1				
INSUMO:	ZINCO QUELATO 20%			
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	BRASIL/BRASIL	DATA DE ANÁLISE:	10/05/2010	
LOTE PHARMA NOSTRA:	10041427A	LOTE FABRICANTE:	10ZN61-A.	
DATA DE FABRICAÇÃO:	Março/2010	DATA DE VALIDADE:	Março/2012	
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	TEMPERATURA ENTRE 15°C a 30°C			
DATA DE EMISSÃO:	20/05/2010	NF:	1-023.569	ORDEM FRACIONAMENTO:
				1815-10
Descrição*	Pó branco amarelado a levemente amarelado, com cheiro característico dos aminoácidos	Pó levemente amarelado com cheiro característicos dos aminoácidos		Fabricante
pH (Solução 1%)*	6,0 - 11,0		7,58	Fabricante
Perda por Dessecação*	≤ 7,0% (1 hora / 100°C)		4,01%	Fabricante
Densidade*	0,40 - 0,70 g/mL		0,42 g/mL	Fabricante
Granulometria*	Malha 80		Retém 4,41%	Fabricante
	Malha 100		Retém 3,39%	Fabricante
Teor de Zn*	≥ 17%		22,72%	Fabricante
Chumbo	≤ 20 ppm		< 0,2 ppm	Fabricante
Arsênio	≤ 2 ppm		< 0,5 ppm	Fabricante
Mercurio	≤ 1 ppm		< 0,003 ppm	Fabricante
TESTES MICROBIOLÓGICOS				
Contagem total de bactérias*	≤ 1000 UFC/g		< 10 UFC/g	Fabricante
Fungos e leveduras*	≤ 100 UFC/g		< 10 UFC/g	Fabricante
Escherichia coli*	Ausente		Ausente	Fabricante
Salmonella sp*	Ausente		Ausente	Fabricante
Pseudomonas aeruginosa*	Ausente		Ausente	Fabricante
Staphylococcus aureus*	Ausente		Ausente	Fabricante
Bactérias gram negativa bile tolerantes*	Ausente		Ausente	Fabricante
Candida albicans*	Ausente		Ausente	Fabricante
Clostridium sp	Ausente		Ausente	Fabricante

*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANAPOLIS). E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

** Obtido por Quelação de Metal em glicina.

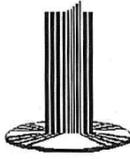
LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopeia) / EP (European Pharmacopeia) / BP (British Pharmacopeia) / JP (Japanese Pharmacopeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ Pharma Nostra).

Handwritten notes:
 Solução 1% em água
 pH: 6,2
 D: 0,36 g/mL

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado

Handwritten signature: Rocha
 Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
 Danielle Rocha Barbosa - CRF-GO N° 7003

Handwritten signature: Amin Gabriel Gebrim
 Responsável Técnico
 Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO N° 1829



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 471 /2012 da Pesquisadora landara Schettert Silva, referente ao projeto de pesquisa, "Avaliação da hidroxiapatita dopada com gálio em reparos ósseos ", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 21 de novembro de 2012 .

Joice Stein
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 27 de novembro de 2012.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE**



RESOLUÇÃO No. 124/2012 de 25 de outubro de 2012.

O COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE DA FACULDADE DE MEDICINA DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em sua 4ª Reunião Ordinária realizada em 25 de outubro de 2012 no uso de suas atribuições legais, resolve:

Aprovar o projeto de pesquisa em nível de Mestrado intitulado: “Avaliação da hidroxiapatita dopada com gálio em reparos osséos” de responsabilidade da Profa. Dra. Iandara Schettert Silva e do aluno Pedro Carvalho Cassino.


Ricardo Dutra Aydos