



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA**

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

TITO HENRIQUE DE NORONHA ROCHA

Administração sistêmica de teriparatida aumenta a osteointegração de enxertos desvitalizados em defeitos críticos femorais em modelo murino

**RIO DE JANEIRO
Setembro**

2016

TITO HENRIQUE DE NORONHA ROCHA

Administração sistêmica de teriparatida aumenta a osteointegração de enxertos desvitalizados em defeitos críticos femorais em modelo murino

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. João Antônio Matheus Guimarães
Dra. Maria Eugênia Leite Duarte

RIO DE JANEIRO
Setembro
2016



TITO HENRIQUE NORONHA ROCHA

**Administração sistêmica de teriparatida aumenta a osteointegração
de enxertos desvitalizados em defeitos críticos femorais em modelo
murino**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético
do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Banca examinadora

Profa. Dra. Verônica Fernandes Vianna (INTO)

Prof. Dr. Rubens Antunes Filho (UFF)

Prof. Dr. William Dias Belangero (UNICAMP)

Revisor e suplente: Marco Bernardo Cury Fernandes (INTO)

Rio de Janeiro

Setembro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

R672a Rocha, Tito Henrique de Noronha.
Administração Sistemática de Terapatida Aumenta a Osteointegração de
Enxertos Desvitalizados em Defeitos Críticos Femorais em Modelo Murino /
Tito Henrique de Noronha Rocha. — 2016.
71f.

Orientadores: João Antônio Matheus Guimarães e Maria Eugênia Leite
Duarte.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2016.

1. Paratormônio. 2. Teriparatida. 3. Defeito ósseo crítico. 4. Enxerto
ósseo desvitalizado. 5. Consolidação óssea. 6. Osteointegração óssea. 7.
Ortopedia. I. Guimarães, João Antônio Matheus; Duarte, Maria Eugênia
Leite, orient. II. Título.

NLM WE 865

Dedicatória

A Renata e Mariana, que me estimulam
todos os dias a tentar ser uma pessoa melhor e a sonhar mais.

Aos meus pais, que possibilitaram os fundamentos
para que todos os sonhos se transformassem em realidade.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Este trabalho não é o resultado de um esforço individual. Ele nasceu e foi desenvolvido com significativas contribuições de pessoas fundamentais a essa construção. Pessoas que acreditam que a generosidade acadêmica e de ideias pode ser um ideal em si. Se consegui chegar até aqui foi porque tive a oportunidade de me apoiar nos ombros de grandes professores.

Agradeço ao meu orientador e amigo, Dr. João Matheus, que me guiou desde os primeiros passos no INTO, acreditando em meu potencial e me motivando a crescer como profissional e pessoa.

À minha orientadora, Dra. Maria Eugênia, uma verdadeira tutora, presente em todas as fases da gênese desta tese de mestrado.

Às Dras. Rafaela Sartore e Amanda Cavalcanti e todo grupo de estagiários e técnicos do Laboratório do Centro de Terapia Celular, pelo comprometimento com o projeto, companheirismo e apoio.

Aos Professores Karlos Mesquita e Carlos Giesta, por me mostrarem os primeiros passos na arte de curar algumas vezes, aliviar quase sempre e consolar sempre.

Aos meus companheiros das trincheiras da ortopedia, Carlos Eduardo e Eduardo Varela, pela amizade que se fortalece diariamente.

A todas aquelas pessoas com as quais tive o privilégio de partilhar a grande aventura da vida, pelos ensinamentos e troca de conhecimentos.

RESUMO

ROCHA, Tito Henrique Noronha. Administração sistêmica de teriparatida aumenta a osteointegração de enxertos desvitalizados em defeitos críticos femorais em modelo murino. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2016.

Os defeitos segmentares em ossos longos, secundários à ressecção tumoral, traumas e desbridamento após infecção são tratados frequentemente com aloenxertos maciços desvitalizados. Entretanto, a baixa capacidade de formação e de remodelação óssea dos aloenxertos resulta em altas taxas de falência clínica, acarretando em pseudoartrose e fratura tardia do enxerto. A exposição intermitente ao PTH₁₋₃₄ (teriparatida) tem efeito anabólico no tecido ósseo, aumentando a massa óssea e a resistência do osso cortical e esponjoso. Um conjunto crescente de evidências favorecem a hipótese de que o PTH₁₋₃₄ acelera a consolidação de fraturas, podendo ser utilizado como terapia adjuvante sistêmica para aumentar a osteointegração nas reconstruções maciças com aloenxertos. Assim, esse estudo teve como objetivo investigar em um modelo murino de defeito ósseo crítico segmentar se a administração sistêmica e intermitente de PTH₁₋₃₄ acelera a consolidação de aloenxertos. Vinte e sete camundongos C57BL/6 machos com 15 semanas, foram submetidos a ostectomia médio-diafisária femoral para criação de um defeito crítico. Após a exposição do fêmur, foi posicionada sobre a sua superfície uma placa de titânio com seis furos fixada com parafusos de fixação bloqueados. Os orifícios correspondentes as posições centrais permaneceram sem parafusos e foram utilizados como referência para criação de um defeito com 2,5-3,0 mm na porção médio-diafisária do fêmur. Os defeitos foram preenchidos com um segmento femoral acelular alogênico e os animais foram alocados em três grupos (n=9 por grupo) de acordo com a dose (30 ou 40 µg/kg/dia) do tratamento por duas semanas com PTH₁₋₃₄ ou com salina (grupo controle). Os animais foram mantidos sem tratamento durante sete dias e submetidos à eutanasia ao final da terceira semana após a cirurgia. A consolidação do enxerto foi monitorada com exame radiográfico semanal e as amostras do fêmur foram submetidas à análise histológica. Para investigar o efeito das duas doses utilizadas do PTH₁₋₃₄, células estromais da medula óssea foram obtidas de tíbias e fêmures de camundongos tratados por sete dias com injeções subcutâneas diárias de 30, 40 µg/kg PTH₁₋₃₄ ou salina. O ensaio de eficiência em formação de colônias (CFE) foi utilizado para quantificar a frequência de progenitores mesenquimais. O tamanho do defeito foi similar entre os grupos PTH 30 ($2,7 \pm 0,4$ mm), PTH 40 ($3,1 \pm 0,5$ mm) e salina ($2,5 \pm 0,4$ mm). As superfícies endosteal e periosteal, na avaliação da terceira semana, contribuíram para a osteointegração do aloenxerto resultando em taxa de consolidação similar entre os grupos. Comparado ao grupo salina, o grupo PTH 30 apresentou maior neoformação óssea no interior do enxerto ($13,7 \pm 4,6\%$ vs. $7 \pm 3,7$, $p=0,03$) e na interface entre o aloenxerto com o osso hospedeiro ($0,06 \pm 0,02$ mm³ vs. $0,043 \pm 0,015$ mm³ no grupo salina e $0,045 \pm 0,02$ mm³ no grupo PTH 40, $p=0,007$). Os resultados *in vitro* mostraram não haver diferença significativa do diâmetro das colônias e o número de CFE entre os grupos. Em conclusão, o conjunto dos resultados do presente estudo mostra que 30 µg/Kg PTH₁₋₃₄ administrado durante duas semanas potencializa o reparo e a osteointegração de aloenxertos em um modelo murino de reconstrução de defeito femoral crítico. Esses resultados preliminares podem vir a alicerçar estudos em animais de grande porte e esclarecer os mecanismos responsáveis pela ação anabólica do PTH₁₋₃₄ visando a ampliação do seu uso clínico com essa indicação.

Palavras chave: Paratormônio. Teriparatida. Defeito ósseo crítico. Enxerto ósseo desvitalizado. Consolidação óssea. Osteointegração óssea.

ABSTRACT

ROCHA, Tito Henrique Noronha. Systemic administration of teriparatide enhances osteointegration of devitalized bone grafts in critical-sized femoral defects in a murine model. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2016.

Segmental defects in long bones, secondary to tumor resection, trauma, and debridement after infection are frequently treated with devitalized massive allografts. However, limited new bone formation and lack of remodeling in decellularized allografts are associated with high rates of clinical healing failure, such as non-union and late graft fracture. The intermittent exposure to PTH₁₋₃₄ (teriparatide) has an anabolic effect on bone enhancing mass and strength of both cancellous and cortical bone. A growing body of evidence also supports that PTH₁₋₃₄ accelerates fracture healing and, therefore, could be used as a systemic adjuvant therapy to improve osseointegration in massive allograft reconstruction. A growing body of evidence support the hypothesis that the PTH₁₋₃₄ accelerate fracture healing and can be used as an systemic adjuvant therapy to increase osteointegration in massive allograft reconstructions. Thus, this study aimed to investigate if systemic intermittent administration of PTH₁₋₃₄ would accelerate massive allograft healing in a murine model of segmental bone defect. Twenty-seven, 15-week-old male C57BL/6 mice underwent a mid-diaphyseal femoral osteotomy for the establishment of a segmental bone defect. Briefly, after a longitudinal cutaneous incision along the femur, a titanium microlocking plate was applied on the anterior femoral side. Self-tapping locking screws were inserted and locked to secure the plate. Using the two central holes of the plate as reference, a 2.5-3.0 mm long mid-diaphyseal femoral osteotomy was performed. The defects were filled with an acellular femoral segment from an allogeneic strain and the animals were then randomly assigned to three groups according to PTH₁₋₃₄ dosing regimens. Daily doses of human PTH₁₋₃₄ (30 and 40 µg/kg/day) or saline were administered to the mice (n=9 per group) during two weeks. The mice were maintained without therapy for 7 days, and then euthanized 3 weeks post-surgery. Allograft healing was monitored by weekly X-rays, and the grafted femurs were harvested and used for histological analyses. To assign the differential effects of PTH₁₋₃₄ doses, primary bone marrow derived cells were harvested from tibias and femurs of mice treated daily with subcutaneous injections of 30, 40 µg/kg PTH₁₋₃₄ or saline for 7 days. Colony forming efficiency (CFE) assay was used to quantify the approximate frequency of stromal cell progenitors. The defect size was uniform between PTH₁₋₃₄ 30 µg/kg (2.7 ± 0.4 mm), PTH₁₋₃₄ 40 µg/kg (3.1 ± 0.5 mm) and saline (2.5 ± 0.4 mm) groups. At the 3-week endpoint, both periosteal and endosteal surfaces contributed to allograft osteointegration, and the union ratio was similar within the groups. Compared to saline group, the 30 PTH group showed greater bone formation within the graft ($13.7 \pm 4.6\%$ vs. 7 ± 3.7 , $p = 0.03$) and at the interface between host bone and allograft (mm^3 vs. 0.06 ± 0.02 0.043 ± 0.015 mm^3 in the saline group, and 0.045 ± 0.02 mm^3 in the PTH group 40, $p = 0.007$). *In vitro* results showed no significant difference in the diameter of the colonies and the number of CFE between groups. In conclusion, the present study ensemble results shows that 30 µg/Kg PTH₁₋₃₄ administered for two weeks enhances the repair and osteointegration of allografts in a murine model of critical femoral defect reconstruction. These preliminary results may substantiate studies in large animals and clarify the mechanisms responsible for the anabolic action of PTH₁₋₃₄ aiming to expand its clinical use for this indication

Keywords:

Parathormone. Teriparatide. Bone segmental defect. Bone critical-sized defect. Bone devitalized graft. Bone consolidation. Bone osteointegration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Representação esquemática das opções de tratamento de defeito crítico segmentar.	16
Figura 1-2. Mecanismo de ação do PTH sobre os níveis de cálcio.	21
Figura 1-3. Ação osteoanabólica do PTH.	23
Figura 3-1: Linha temporal do desenho experimental <i>in vivo</i> .	32
Figura 3-2. Acesso cirúrgico e material de síntese.	34
Figura 3-3. Tempos cirúrgicos para criação e reconstrução do defeito ósseo.	36
Figura 3-4. Diagrama ilustrando os pontos de avaliação da consolidação óssea nas interfaces entre o osso hospedeiro e o enxerto alogênico.	39
Figura 3-5. Esquema ilustrativo da região de interesse (ROI).	40
Figura 3-6. Linha temporal do desenho experimental <i>in vitro</i> .	41
Figura 4-1. Tamanho do defeito na porção central da diáfise femoral.	45
Figura 4-2. Radiografias simples do fêmur esquerdo 21 dias após a ostectomia sem enxertia.	46
Figura 4-3. Radiografia do fêmur esquerdo realizada no pós-operatório imediato.	46
Figura 4-4. Radiografias simples mostrando consolidação do enxerto.	47
Tabela 1. Índices de consolidação dos enxertos nos três grupos experimentais.	48
Figura 4-5. Neoformação óssea na cavidade medular do enxerto.	49
Figura 4-6. Porção central da cavidade medular de enxerto de animal do grupo PTH 30.	49
Figura 4-7. Porção central da cavidade medular de enxerto de animal do grupo PTH 40.	50
Figura 4-8: Porção central da cavidade medular de enxerto de animal do grupo salina.	50
Figura 4-9: Neoformação óssea nas corticais consolidadas.	51
Figura 4-10: Quantificação da neoformação óssea nas interfaces consolidadas.	52
Figura 4-11. Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides (CFE) em animais tratados com teriparatida ou salina.	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Percentual
°C	Graus centígrados
BMP2	Proteína morfogênica óssea 2
BMP7	Proteína morfogênica óssea 7
BMSC	Células estromais derivadas da medula óssea
Ca ²⁺	Ion cálcio
CFE	Ensaio de eficiência de colonias
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblastoides
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
EUA	Estados Unidos da América
h	Hora
kg	kilograma
µg	Micrograma
µm	Micrometro
mg	Miligrama
mL	mililitro
mm	Milímetro
Mm ²	Milímetro quadrado
PTH	Paratormônio
PTH ₁₋₃₄	Teriparatida
SBF	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de saúde

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	viii
LISTRA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Perdas ósseas	12
1.2 Tipos de tratamento dos defeitos ósseos críticos	13
1.3 Consolidação óssea	17
1.4 Paratormônio	20
1.5 Teriparatida e osteoporose	24
1.6 Teriparatida e reparo ósseo	26
1.7 Uso <i>off-label</i> da teriparatida em trauma ortopédico	28
1.8 Justificativa	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Modelo <i>in vivo</i>	32
3.2.1 Procedimento cirúrgico: anestesia e analgesia	33
3.2.2 Fixação da placa e criação do defeito segmentar	33
3.2.3 Reconstrução do defeito com enxerto ósseo alogênico	34
3.2.4 Pós-operatório	36
3.3 Tratamento com teriparatida	37
3.4 Análise radiográfica	37
3.5 Análise Histológica	38
3.5.1 Avaliação da consolidação do enxerto	38
3.5.2 Análise histomorfométrica	39
3.5.2.1 Revitalização do enxerto	39
3.5.2.2 Neoformação óssea nas corticais consolidadas	40
3.6 Modelo <i>in vitro</i>	41
3.6.1 Isolamento de células estromais da medula óssea e ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE).	41
3.7 Análise Estatística	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Modelo <i>in vivo</i>	44
4.1.1 Aspectos intra e peri-operatórios	44
4.1.2 Evolução clínica	44
4.1.3 Avaliação radiográfica do defeito	45
4.1.4 Avaliação histológica da consolidação do enxerto	47
4.1.5 Avaliação histomorfométrica da revitalização do enxerto.	48
4.1.6 Avaliação histomorfométrica das interfaces consolidadas.	51

4.2 Modelo <i>in vitro</i>	53
4.2.1 Frequência de progenitores estromais da medula óssea em animais tratados com teriparatida	53
5 DISCUSSÃO	54
5.1 Estabelecimento e validação do modelo murinho de defeito ósseo segmentar crítico.	54
5.2 Ações do PTH ₁₋₃₄ sobre a incorporação de aloenxertos estruturais	56
6 CONCLUSÕES	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO 1. <i>Intermittent parathyroid hormone treatment improves bone formation in devitalized allografts in a murine model of femoral segmental defect - Apresentação oral no 15th Biennial Conference of the International Society for Fracture Repair</i>	72

1 Introdução

1.1 Perdas ósseas

Os traumas nos membros inferiores são a principal causa de internações hospitalares em adolescentes e adultos jovens (idade entre 18 e 54 anos), correspondendo a 250.000 admissões hospitalares por ano nos EUA. Mais da metade desses são causados por traumas graves, envolvendo fraturas expostas, lesões por esmagamento ou lesões tegumentares extensas resultantes de acidentes automobilísticos, quedas de grande altura e acidentes industriais. Tradicionalmente, pacientes com lesões provocadas por traumas de alta energia, que resultam em fraturas complexas com grande perda óssea e lesões musculares e tegumentares extensas, eram tratados com a amputação do segmento. No entanto, o manejo das lesões ósseas traumáticas agudas passou por uma grande transformação nas últimas décadas (MACKENZIE e BOSSE, 2006).

As perdas ósseas podem ocorrer por extrusão do fragmento no momento do trauma ou durante o procedimento de desbridamento cirúrgico de uma fratura exposta, quando um segmento é removido resultando um defeito ósseo. Quando o defeito ósseo é maior do que dois centímetros, é denominado de defeito segmentar ou crítico e tem como principal característica a incapacidade de reparo e regeneração espontâneas (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986). Entretanto, defeitos segmentares envolvendo uma área de secção óssea transversa maior que 50%, mas com preservação do contato entre os fragmentos ósseos principais, apresentam potencial de consolidação. Contudo, sempre haverá necessidade da instalação de tratamento

adicional para que o volume e resistência óssea às forças fisiológicas retornem aos parâmetros normais (KEATING *et al.*, 2005) .

1.2 Tipos de tratamentos dos defeitos críticos

Segundo OBREMSKEY *et al.* (2014) não existe até o momento um algoritmo validado para o tratamento dos defeitos segmentares com perdas ósseas graves. Os princípios atuais do tratamento cirúrgico das fraturas se baseiam na obtenção de um grau de estabilidade suficiente com mínima agressão ao suprimento vascular ósseo. Desta forma, a revascularização dos fragmentos fraturados e a mobilização do segmento lesionado acarretam melhor prognóstico dos pacientes vítimas de lesões traumáticas. Além disso, os avanços tecnológicos no desenho e metalurgia dos implantes possibilitam reconstruções da anatomia funcional óssea nas mais diversas situações.

Entretanto, apesar do avanço na definição de conceitos, na abordagem clínica e na evolução tecnológica, a reconstrução de perdas ósseas extensas continua sendo um grande desafio para o cirurgião ortopédico. A meta a ser atingida é a obtenção de uma extremidade funcional de forma eficaz. Porém a maioria das técnicas de reconstrução é de difícil reprodução em larga escala, têm índices de consolidação pouco preditivos, os métodos de tratamento não são bem tolerados pelos pacientes e, por essas razões, frequentemente se associam com tempo muito longo para que ocorra o reparo completo da lesão e recuperação funcional integral do paciente (COURT-BROWN *et al.*, 2012).

Na diáfise dos ossos longos, os defeitos críticos não tem um tratamento padrão. Usualmente a estabilização mecânica óssea pode variar entre uma osteossíntese provisória ou definitiva, dependendo do tipo de trauma inicial e do segmento lesado. O tratamento definitivo é realizado preferencialmente com um sistema de estabilização interno do tipo placa e parafusos ou haste intramedular e parafusos. Contudo, a estabilidade mecânica é apenas parte da equação que leva à consolidação dos defeitos críticos diafisários. Nos defeitos que medem entre seis a quinze centímetros, usualmente a fixação interna é associada com enxerto ósseo autólogo, que pelas suas características de prover osteogênese, osteocondução e osteoindução, favorecem a consolidação óssea (TZIOUPIS e GIANNOUDIS, 2007). Porém, o uso de enxerto ósseo autólogo na tentativa de favorecer a biologia local e obter a consolidação é um procedimento cirúrgico que apresenta limitações. Além de apresentar taxas de complicações elevadas no sítio doador, tais como infecção, formação de seroma, hematoma, dor crônica, instabilidade pélvica e hérnias em até 21,8% dos pacientes, existe a questão da disponibilidade limitada para obtenção de tecido ósseo e do tempo de cirurgia longo. A ausência de vascularização é um fator limitador, uma vez que o processo de osteointegração resulta da substituição óssea e a difusão de oxigênio e nutrientes é inversamente proporcional à distância do tecido sadio (MAHENDRA e MACLEAN, 2007; MICLAU *et al.*, 2007).

Outra opção para o tratamento definitivo dos defeitos ósseos críticos é o transporte ósseo com fixadores externos, também chamada de osteogênese por distração. Este procedimento foi desenvolvido por Ilizarov, que ao contrário de conceitos predecessores, utilizou o fixador externo circular e com fios finos e pré-

tencionados como método de estabilização, permitindo uma função satisfatória durante o processo de transporte ósseo (ILIZAROV, 1990). A osteogênese por distração dispensa o uso maciço de enxerto ósseo, permite a função de suporte do peso no segmento lesionado e estimula a angiogênese. As desvantagens deste método incluem a dificuldade na colocação do fixador, o alto custo e longa duração do tratamento, que muitas vezes leva à rigidez articular. Para o sucesso do método é fundamental o comprometimento e a adesão do paciente para a correta manutenção e ajuste do aparelho de fixação externa (ARONSON, 1994).

O enxerto micro cirúrgico vascularizado tem sido utilizado recentemente em centros especializados de cirurgia reconstrutora, tem a grande vantagem de prover um aporte sanguíneo através da anastomose vascular, fazendo com que exista um processo de consolidação semelhante ao da fratura aguda (SCHEUFLETER *et al.*, 2008). Entretanto, na prática clínica o processo de consolidação do osso transplantado ao osso nativo do paciente não é confiável, sendo necessário em muitas vezes a utilização suplementar de enxerto autólogo. Outra questão levantada é a morbidade no local da retirada do enxerto, assim como a grande dificuldade técnica do procedimento, que necessita de especialista com formação específica (PERRY, 1999). Cabe ressaltar que muitas vezes existe uma discrepância entre a capacidade estrutural do enxerto e as necessidades locais onde ele será utilizado, o que pode levar a fraturas por estresse em até 25% das reconstruções (MORAN *et al.*, 2006) (Figura 1-1).

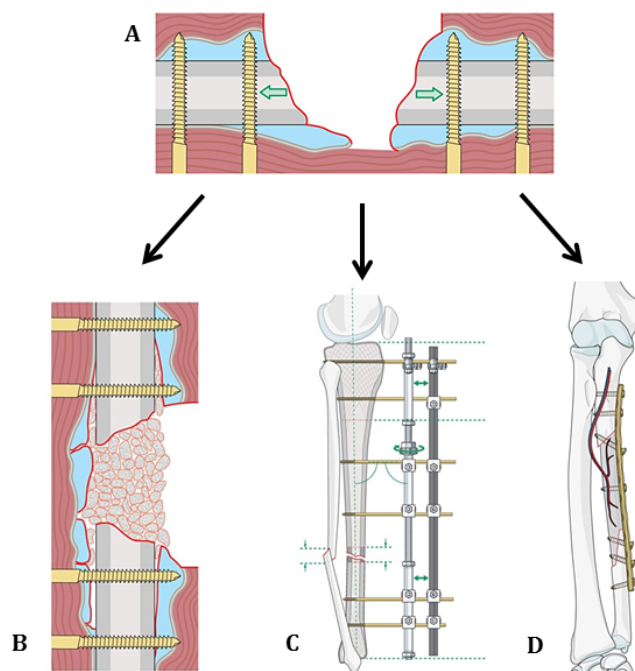


Figura 1-1. Representação esquemática das opções de tratamento de defeito crítico segmentar. (A) Defeito segmentar diafisário. (B) Enxertia óssea autóloga. (C) Transporte ósseo com fixação externa. (D) Enxerto ósseo vascularizado. Adaptado de RUEDI *et al.*, 2008.

A utilização de aloenxerto ósseo foi introduzida para superar o problema da morbidade do sítio doador, assim como a questão da disponibilidade e da capacidade de suporte estrutural. A sua aplicação não demanda técnica especial e pode estar disponível em diferentes apresentações. As desvantagens do método são a ausência de capacidade osteogênica e osteoindutora, a dificuldade de manutenção de uma estrutura de banco de tecidos e assim como no enxerto autólogo, os aloenxertos são não vascularizados e tem limitações em relação à integração com o osso hospedeiro. A infecção, a pseudoartrose e a fratura são complicações ligadas à natureza avascular deste tipo de enxerto (MAHENDRA e MACLEAN, 2007).

1.3 Consolidação óssea

O osso tem uma capacidade única de regeneração após danificado, resultando em tecido da mesma qualidade, estrutura e arquitetura. O trauma de alta energia, a ressecção tumoral, a cirurgia de revisão e a infecção osteoarticular podem levar a uma quantidade significativa de perda óssea e grandes defeitos com um potencial de reparo limitado. Esses defeitos ósseos impõem um grande problema socioeconômico, uma vez que têm um grande impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, causado por repetidas cirurgias e tempo prolongado de internação. Existem aproximadamente 6,3 milhões de fraturas cada ano nos EUA, com mais de 500.000 procedimentos de enxertia óssea, com custo em torno de \$2,5 bilhões de dólares (PNEUMATICOS *et al*, 2010).

Diversas outras abordagens biológicas e biofísicas foram desenvolvidas para superar os problemas que envolvem as técnicas de enxertia óssea, tais como terapia genética, utilização de biomateriais osteocondutores associados ou não a fatores de crescimento, aspirados de medula óssea, células osteoprogenitoras, terapias de onda de choque dentre outras . Porém, as evidências clínicas da eficácia dessas modalidades de tratamento não são claramente definidas, assim como a forma de ação, as indicações clínicas, o tempo e a dose terapêutica (CANALIS, 1993). A maioria dos estudos que analisam esse assunto são séries de casos, sem critérios de inclusão ou exclusão claros, que envolvem populações de pacientes heterogêneos, o que aumenta a dificuldade das avaliações (COOK *et al*, 1994).

Apesar do avanço tecnológico e de novas técnicas cirúrgicas que permitem a modulação do processo biológico que leva à consolidação óssea, pouco se avançou em

situações onde o envelope de partes moles e a vascularização sofreram uma agressão de grande intensidade (SWIONTKOSKI *et al.*, 2006). Neste cenário, o ambiente biológico é árido e pouco capaz de dar suporte aos fenômenos naturais que evoluem para o reparo tecidual. Neste contexto, é importante salientar que não basta reconstruir o ambiente mecânico, através da obtenção de estabilidade com os métodos contemporâneos de osteossíntese. É necessário garantir que simultaneamente haja a restituição da capacidade biológica local que resulte na regeneração tecidual. Esta deve ser a meta do tratamento moderno das lesões complexas dos membros, que envolvam grandes perdas ósseas segmentares (WU *et al.*, 2003).

Os modelos animais podem ser uma opção para reproduzir a situação de defeito crítico diafisário (SENKOYLU *et al.*, 2005). Muitas vezes os modelos animais apresentam como limitação o tipo de estabilização óssea, que não confere estabilidade mecânica e nem o padrão de reprodutibilidade necessária aos ensaios laboratoriais. Mas apesar disso é possível reproduzir e padronizar em modelos animais a destruição do suprimento vascular, a lesão do envoltório muscular e a fragmentação óssea irregular, que são aspectos importantes para o desfecho clínico (WEINREB *et al.*, 1999).

Durante as últimas duas décadas, o conhecimento sobre dos processos biológicos que levam à consolidação óssea evoluíram rapidamente. O osso é um dos poucos tecidos com capacidade de regenerar completamente o tecido lesado, sem formação de cicatriz fibrosa residual. Sendo assim, a consolidação de uma fratura recapitula o desenvolvimento ósseo e pode ser considerada uma forma de

regeneração tecidual total. Porém, a despeito da capacidade regenerativa do tecido ósseo, esse processo biológico algumas vezes é falho, sobretudo quando o ambiente biológico é desfavorável, como nos traumas de alta energia que resultam em defeitos ósseos críticos que, com certa frequência evoluem para situações caracterizadas por ausência de consolidação (PENG *et al.*, 2005).

A consolidação das fraturas pode ocorrer de forma direta ou indireta . A forma indireta é mais comum e ocorre através do processo de ossificação endocondral, tipicamente em situações onde existe certo grau de movimento dos fragmentos ósseos no foco de fratura. Imediatamente após o trauma no local da fratura há a formação do hematoma, que é seguido de resposta inflamatória. Esta etapa é necessária para o progresso da consolidação, e é mantido através da secreção local de moléculas pró-inflamatórias que estimulam a angiogênese e, simultaneamente, a diferenciação e a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. A chave para o processo de consolidação indireta é a formação de um calo cartilaginoso, que posteriormente sofrerá mineralização, reabsorção e substituição por osso neoformado que irá originar o calo rígido que, em última análise, confere estabilidade às estruturas anatômicas (MARSELL e EINHORN, 2011).

A evolução do processo de consolidação através desses estágios depende diretamente de fatores sistêmicos e locais responsáveis pelo recrutamento de osteoprogenitores da medular óssea, do envoltório de tecidos moles e do periósteo (BESSA *et al.* 2008).

No outro extremo do espectro, a consolidação direta ou *per-prima* depende diretamente da redução anatômica e da fixação estável dos fragmentos ósseos. Neste

tipo de consolidação, ocorre remodelação direta de osso lamelar e reestabelecimento da organização haversiana entre os fragmentos fraturários, sem a formação intermediária do calo ósseo (MARSELL e EINHORN, 2011).

1.4 Paratormônio

O paratormônio (PTH) é um hormônio polipeptídico com 84 aminoácidos (1-84), sintetizado pelas glândulas paratireoides e liberado através de uma dinâmica circadiana ou em pulsos aleatórios. Através da ação nos principais órgãos alvos ossos e rins e indiretamente no trato digestivo, facilitando a ativação da vitamina D, o PTH mantém os níveis séricos de cálcio na faixa de normalidade (SILVA *et al.*, 2011). Este controle é feito através de um mecanismo de *feedback* negativo, onde a secreção e liberação de PTH pelas paratireoides é controlada pelos níveis séricos de $[Ca^{2+}]$ (BROWN *et al.*, 1993). Em resposta a um estímulo hipocalcêmico, ocorre aumento na síntese e liberação de PTH que, por sua vez, promove elevação da concentração de cálcio sérico através do aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos e pelo aumento da reabsorção renal e gastrointestinal de cálcio (Figura 1-2) (HANLEY *et al.*, 2008).

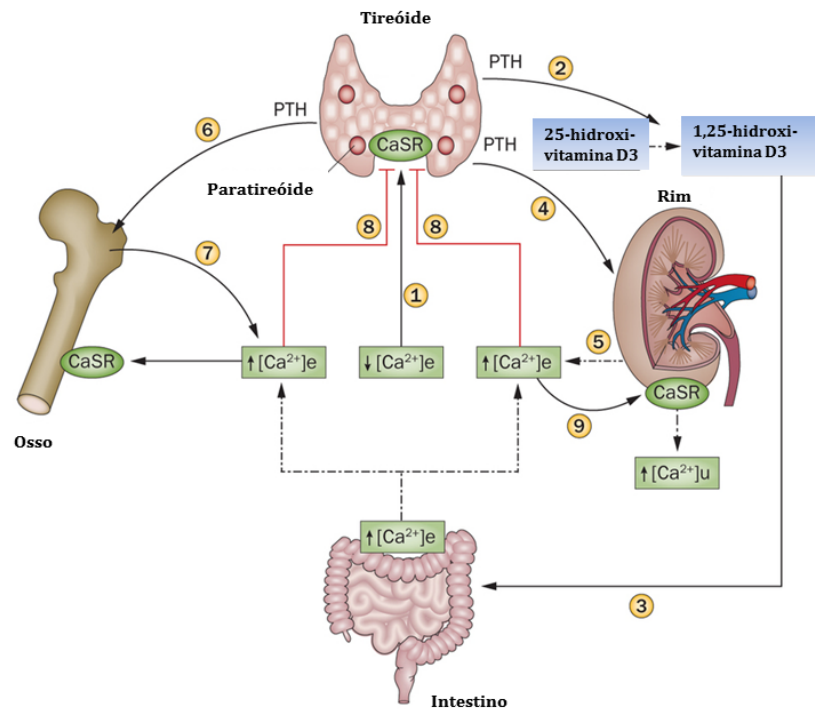


Figura 1-2. Mecanismo de ação do PTH sobre os níveis de cálcio. A queda dos níveis de cálcio extracelular acarreta na redução da ativação dos receptores sensíveis ao cálcio (CaSR) localizados na glândula paratireoide (1) e aumento na liberação de PTH (2), que estimula a conversão da forma inativa da vitamina D (25-vitamina D3) na forma ativa (1,25-vitamina D3). Esta, por sua vez, promove o aumento da absorção intestinal de cálcio (3), elevando a concentração de cálcio no meio extracelular $[Ca^{2+}]_e$. O aumento da secreção de PTH promove aumento da reabsorção renal de Ca^{2+} (4) que resulta em aumento dos níveis de $[Ca^{2+}]_e$ (5) e também promove aumento da remodelação óssea (6). Esses efeitos resultam no aumento da reabsorção óssea (inicialmente do osso compacto da cortical) e liberação de Ca^{2+} que resulta no aumento dos níveis de $[Ca^{2+}]_e$ (7). A elevação dos níveis de $[Ca^{2+}]_e$ estimulam os CaSR localizados no tecido ósseo que, por sua vez, aumentam a remodelação óssea favorecendo a reabsorção. O aumento cumulativo dos níveis de $[Ca^{2+}]_e$ ativa os CaSR localizados na paratireoide (8) inibindo a liberação de PTH. Os níveis elevados de $[Ca^{2+}]_e$ ativam os CaSR localizados no rim (9) aumentando a excreção renal de cálcio ($[Ca^{2+}]_u$). $[Ca^{2+}]_e$: Ca^{2+} no líquido extracelular; $[Ca^{2+}]_u$: Ca^{2+} urinário; CaSR (*calcium-sensing receptor*): Receptor sensível ao cálcio, PTH: paratormônio. Adaptado de GOLTZMAN e HENDY (2015).

A ação do PTH sobre os órgãos alvos é dada pela interação com o receptor PTH1R expresso pelos osteoblastos no osso e pelas células tubulares no rim (DATTA e ABOU-SAMRA, 2009). O efeito catabólico máximo do PTH é expresso no

hiperparatireoidismo primário, quando há exposição continuada a níveis elevados. O principal mecanismo desta ação catabólica é o aumento da reabsorção óssea, resultante da ativação indireta dos osteoclastos, através da ação do PTH sobre os osteoblastos (CHAMBERS *et al.*, 1985; McSHEEHY e CHAMBERS, 1986).

A primeira observação de que, em certas circunstâncias o PTH poderia se portar como um agente anabólico, foi feita por DOBNIG e TURNER (1997). Neste estudo, ratos tratados doses baixas diárias de PTH resultou em importante efeito anabólico sobre o osso. Neste experimento, a exposição contínua confirmou o efeito catabólico do PTH.

Os principais mecanismos relacionados com a ação osteoanabólica do PTH são o aumento da população de osteoblastos, decorrente do aumento da osteoblastogênese e/ou pela diminuição dos índices de apoptose osteoblástica (JILKA, 2007; KOUSTENI e BILEZIKIAN, 2008). O aumento da osteoblastogênese, por sua vez, resulta do aumento da diferenciação osteoblástica e, em menor proporção, do aumento da proliferação celular. Desta forma, a ação anabólica do PTH se daria através do controle da progressão dos osteoblastos no ciclo celular, que seriam desviados para ingressar na via de diferenciação para a aquisição do fenótipo osteogênico diferenciado. Independente da ação sobre o ciclo celular, o PTH também estimula diretamente a diferenciação osteoblástica (WANG *et al.*, 2007) (Figura 1-3).

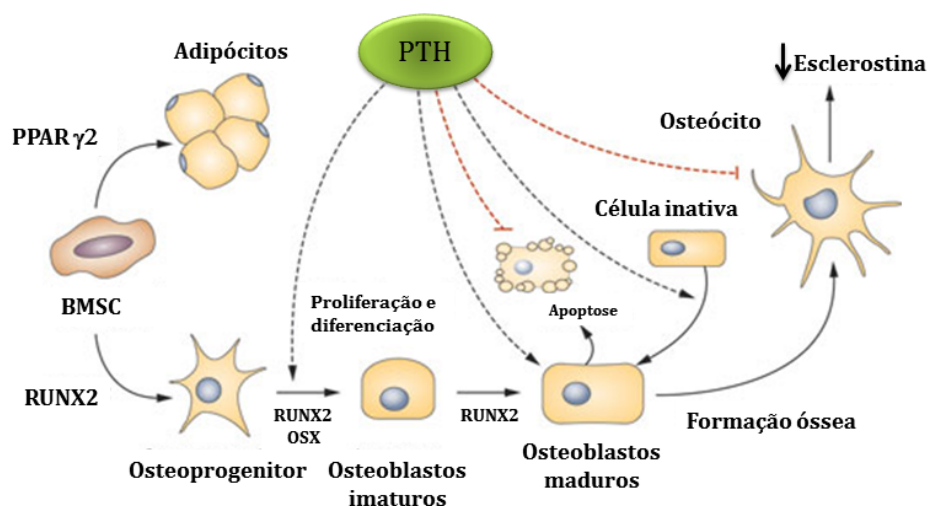


Figura 1-3. Ação osteoanabólica do PTH. A teriparatida, quando administrada de forma intermitente, induz a expressão de RUNX2 pelos osteoblastos que resulta no seu aumento numérico e funcional. O PTH também induz a diferenciação de progenitores comprometidos com a linhagem osteoblástica, inibe a apoptose resultando no aumento da sobrevivência dos osteoblastos, estimula a diferenciação de células inativas em osteoblastos e inibe a produção de esclerostina (inibidor da formação óssea). OSX: osterix; PPARγ2: receptor ativado por proliferadores de peroxisoma; PTH: paratormônio; RUNX2: fator de transcrição relacionado ao Runt 2. Adaptado de KRAENZLIN e MEIER (2011).

O outro mecanismo atribuído ao PTH, relacionado diretamente com o seu efeito anabólico, é a ação inibitória sobre a apoptose osteoblástica, resultando no aumento numérico das células. BELLIDO e colaboradores (2003) demonstraram experimentalmente, em camundongos tratados com injeções diárias de PTH, que os índices de apoptose se relacionavam inversamente com os níveis séricos de osteocalcina e com o número de osteoblastos, sugerindo que o efeito protetor do PTH sobre a sobrevivência celular é em parte responsável pelo seu efeito anabólico sobre o osso.

Relatos de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o PTH aumenta a expressão de genes que sinalizam a formação óssea como o fator de transcrição

específico de osteoblastos *RUNX2*, fosfatase alcalina (CHEN *et al.*, 2002), colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1) e osteocalcina (ISHIZUYA *et al.*, 1997; KRISHNAN *et al.*, 2003; LOCKLIN *et al.*, 2003; ONYIA *et al.*, 2005). A indução da expressão dos genes *osterix* e *Runx2* resulta no direcionamento da diferenciação de precursores mesenquimais em osteoprogenitores (KABACK *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* realizados com células estromais derivadas da medula óssea (BMSC) tratadas com porção biologicamente ativa do PTH de forma intermitente resultaram no aumento de unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F) e de colônias positivas para fosfatase alcalina (NISHIDA *et al.*, 1994). Esses resultados favorecem a hipótese de que a teriparatida atua sobre a diferenciação das BMSC uma vez que foi observada redução da diferenciação dessas células em adipócitos (RICKARD *et al.*, 2006) e potencialização da sua diferenciação em osteoblastos (KABACK *et al.*, 2008, YANG *et al.*, 2009), sem atuar, contudo, sobre o seu potencial proliferativo (YANG *et al.*, 2009).

Adicionalmente, foi observado que o perfil da expressão gênica se altera em condições de exposição intermitente ou contínua ao PTH, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo que a forma de administração regula diferentes grupos de genes, alguns favorecendo a formação e outros favorecendo a reabsorção óssea (LOCKLIN *et al.*, 2003; ONYIA *et al.*, 2005).

1.5 Teriparatida e osteoporose

A teriparatida (PTH₁₋₃₄) é a forma recombinante da molécula de paratormônio humano constituída pela porção biologicamente ativa (cadeia N-

terminal de aminoácidos na posição 1-34), com uso clínico aprovado para o tratamento da osteoporose. Na osteoporose a teriparatida funciona como um agente anabólico aumentando a taxa de formação óssea que, ao predominar sobre a reabsorção, gera um balanço positivo a favor da formação óssea e, conseqüentemente, aumento da massa óssea (JILKA *et al.*, 1999; BUKATA *et al.*, 2010; RYDER *et al.*, 2010).

No relato clínico pioneiro sobre as propriedades osteoanabólicas do paratormônio, NEER e colaboradores (2001) relatam os resultados da administração intermitente de teriparatida a 1637 mulheres com osteoporose pós-menopausa e colapso vertebral. PTH₁₋₃₄ foi administrado durante 24 meses, por via subcutânea na dose diária total de 20 ou 40 µg e os resultados foram comparados com pacientes tratadas com placebo. Em 14% das pacientes tratadas com placebo e em 5 e 4% das pacientes tratadas com 20 ou 40 µg PTH₁₋₃₄, respectivamente, foram diagnosticadas novas fraturas vertebrais. Fraturas não vertebrais, ocasionadas por trauma de baixa intensidade, ocorreram em 6% do grupo placebo e em 3% das pacientes tratadas com PTH₁₋₃₄. O tratamento também induziu um ganho de massa óssea entre 9-13% na coluna lombar e de 3-6% no colo do fêmur.

Entretanto, alguns anos antes deste relato clínico, que universalizou o uso da teriparatida no tratamento da osteoporose, ANDREASSEN e colaboradores (1999) relataram a eficácia da administração intermitente de PTH₁₋₃₄ sobre a consolidação de fraturas na tíbia de ratos. Os autores demonstraram que o PTH₁₋₃₄ atuava sobre a remodelação óssea e sobre a modelação da osteogênese e da condrogênese durante a regeneração óssea, resultando em melhores índices de consolidação.

1.6 Teriparatida e reparo ósseo

Com o avanço no conhecimento das propriedades anabólicas do PTH₁₋₃₄, os tratamentos sistêmicos de diversas condições ortopédicas e, particularmente, em situações em que o processo de reparo ósseo é falho, estão sendo cada vez mais utilizados (EINHORN *et al.*, 2003; TIYAPATANAPUTI *et al.*, 2004; REYNOLDS *et al.*, 2011).

O objetivo da abordagem sistêmica é tornar o ambiente do hospedeiro mais favorável para promover a regeneração óssea (DHILLON e SCHWARTZ, 2011). Os fatores de crescimento de uso local, como as proteínas morfogênicas ósseas 2 e 7 (BMP-2 e BMP-7) são utilizadas como terapia adjuvante na regeneração óssea mas necessitam ser implantadas cirurgicamente e tem efeito fugaz pelo curto período de bioatividade *in vivo* (EINHORN, 2003). Já o PTH₁₋₃₄ pode ser uma opção não cirúrgica para o tratamento de qualquer tipo de lesão óssea, independentemente da sua localização e, além disso a sua administração pode ser controlada tanto em relação a dose quanto a duração do tratamento (DHILLON e SCHWARTZ, 2011).

ALKHIARY e colaboradores (2005), em um modelo experimental em ratos com fratura fechada de fêmur, associaram por 35 dias o tratamento com 5 µg/kg ou 30 µg/kg PTH₁₋₃₄. Após 21 dias de tratamento, os animais tratados com 30 µg/kg apresentaram aumento da rigidez e da resistência torsional, da densidade mineral óssea e do volume do calo cartilaginoso em relação aos animais do grupo controle. Não foi observado aumento do número de osteoclastos nas amostras teciduais, sugerindo que o tratamento com PTH₁₋₃₄ aumenta a formação óssea sem acarretar

aumento simultâneo dos índices de reabsorção. Os autores concluíram que a administração sistêmica diária de PTH₁₋₃₄ produz um efeito anabólico que se sustenta durante toda a fase de modelação da consolidação da fratura.

Em modelo murino de fraturas fechadas, KAKAR e colaboradores (2007) observaram que o PTH₁₋₃₄ teve uma ação preferencial sobre a condrogênese, acarretando na formação de calo cartilaginoso exuberante na fase inicial do processo de consolidação. Já a ação do PTH₁₋₃₄ nas fases mais tardias da consolidação, particularmente na remodelação do calo ósseo, foi dada pela maior velocidade de transformação do osso imaturo em osso lamelar, maior rapidez na mineralização e na contração do calo de fratura, que resultou em restituição mais rápida da forma e da função do osso (KOMATSUBARA *et al.*, 2005).

KABACK e colaboradores (2008) também utilizaram modelo de fratura em ratos tratados com PTH₁₋₃₄ e mostraram que a expressão de osterix e de outros marcadores da diferenciação osteoblástica (osteocalcina e colágeno tipo I) estavam aumentadas no local da fratura. Esses achados sugerem que o tratamento sistêmico com PTH₁₋₃₄ exerça uma ação direta sobre os precursores mesenquimais e sobre a expressão de genes relacionados com a diferenciação osteoblástica.

TAKAHADA e colaboradores (2012) observaram em modelo murino de defeito segmentar no fêmur, preenchidos com enxerto ósseo desvitalizado, que o tratamento com PTH₁₋₃₄ acarretou em maiores índices de consolidação, particularmente devido a menor quantidade de tecido fibroso na interface entre o enxerto e o osso hospedeiro, em relação aos animais do grupo controle.

1.7 Uso *off-label* da teriparatida em trauma ortopédico

Além da sua ação já estabelecida sobre a remodelação óssea na osteoporose, algumas evidências conferem a teriparatida ação local como fator de crescimento que favoreceria a consolidação óssea. Uma das primeiras utilizações *off-label* do PTH₁₋₃₄ foi como terapia adjuvante por cinco semanas em pacientes com fraturas da pelve, resultando em 20% de aumento do volume do calo ósseo (PUZAS *et al.*, 2006). Em outro relato de um paciente com pseudartrose de tíbia, o tratamento com injeções subcutâneas diárias de PTH₁₋₃₄ durante oito semanas resultou em aumento de 278% na área de contato (união) no foco de fratura (REYNOLDS *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos em portadores de pseudartrose de esterno (CHINTAMANENI *et al.*, 2010) e úmero (OTEO-ALVARO *et al.*, 2010). RESMINI e IOLASCON (2007) relataram o caso de uma paciente com 79 anos em tratamento de osteoporose com teriparatida e fratura do terço proximal do úmero que evoluiu com consolidação em 25 dias. RUBERY e BUKATA (2010) relataram uma série de três pacientes com pseudoartrose do processo odontóide que consolidou após tratatamento com PTH₁₋₃₄. PEICHL e HOLZER (2011) relataram redução do tempo de consolidação de fraturas do ramo pubiano de doze para oito semanas em cinco idosos tratados com PTH₁₋₃₄. Outro estudo de caso clínico em paciente com afrouxamento asséptico de prótese de quadril, submetido a duas revisões, houve resposta clínica e densitométrica ao tratamento durante oito meses com teriparatida (ZATI *et al.*, 2011).

Além de relatos de casos isolados, resultados favoráveis foram observados em estudo clínico randomizado, duplo cego, controlado realizado em 102 mulheres em

menopausa, com fratura do terço distal do rádio com fratura do terço distal do rádio tratadas conservadoramente, nas quais foi administrado placebo, 20 µg ou 40 µg PTH₁₋₃₄ diariamente durante oito semanas, a partir do décimo dia pós fratura (ASPENBERG *et al.*, 2010; ASPENBERG e JOHANSSON, 2010). A mediana de tempo entre a ocorrência da fratura e evidência de ponte óssea em três das quatro corticais foi de 9,1, 7,4 e 8,8 semanas nos três grupos, respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto a consolidação entre as duas doses de PTH₁₋₃₄ porém o tempo de consolidação foi menor no grupo tratado com 20 µg em relação ao grupo placebo. A principal conclusão do estudo foi que a consolidação de fraturas do terço proximal do radio pode ser acelerada com doses diárias de 20 µg PTH₁₋₃₄. Em outro estudo randomizado prospectivo controlado foi avaliada a resposta ao tratamento com 100 µg de PTH₁₋₈₄ sobre a consolidação de fraturas da pelve em mulheres pós-menopausa (CANALIS, 2007). O tempo de consolidação das fraturas nas pacientes tratadas com PTH₁₋₈₄ foi significativamente menor (7,8 semanas) em relação ao grupo de pacientes tratadas com salina (12,6 semanas).

Apesar do benefício relatado da terapia adjuvante com PTH₁₋₃₄ na consolidação de fraturas e na incorporação de enxertos ósseos estruturais, ainda não há consenso sobre a dose e o tempo de tratamento que devem ser utilizados com esta finalidade(LOU *et al.*,2016). A dose aprovada para uso clínico no tratamento de osteoporose é 20 µg/dia (0,25 – 0,4 µg/kg/ dia para um indivíduo com 50-80kg respectivamente). Em geral, nos modelos murinos utilizados para avaliar a janela anabólica do PTH₁₋₃₄ são feitas doses diárias de 40 µg/kg que, se transportada para a situação clínica, representa uma dose aproximadamente 100 vezes mais alta. Esta

discrepância entre o ambiente clínico e experimental pode ser explicada pela maior atividade metabólica dos pequenos roedores que, conseqüentemente, necessitariam de maiores doses para expressar o efeito anabólico do PTH₁₋₃₄ (TAKAHADA *et al.*, 2012).

1.8 Justificativa

A etiologia dos defeitos ósseos é multifatorial, incluindo, traumas graves, pseudoartroses, osteomielites crônicas e tumores ósseos. Seu tratamento continua sendo um desafio tanto para o cirurgião quanto para o paciente e, apesar dos avanços recentes das técnicas ortopédicas de reconstrução óssea, a amputação em nosso meio ainda é uma solução final para casos recalcitrantes. O atual Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil possui uma grande lista de pacientes com este tipo de sequela que aguardam por uma solução, sendo que na maioria são jovens em sua melhor fase produtiva de trabalho, determinando altos gastos para a sociedade. A maior parte destes pacientes é submetida ao emprego da fixação externa para a resolução do problema, o que determina um tempo enorme de afastamento do trabalho e representa um método associado a várias complicações locais. O problema existe e, nesse sentido, a proposta de um estudo através do modelo animal visando à possibilidade do emprego do aloenxerto ósseo associado a um adjuvante da regeneração óssea, irá responder a algumas perguntas que hoje o Ortopedista que lida com estes casos, necessita de respostas, ou mesmo de um direcionamento para melhorar o atendimento do nosso paciente do SUS.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração intermitente de teriparatida (PTH₁₋₃₄) sobre a consolidação de aloenxertos na reconstrução de defeitos segmentares em modelo murino.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer modelo murino de falha segmentar óssea de tamanho crítico;
- Avaliar através de análise histológica o processo de consolidação de enxertos alo gênicos empregados na reconstrução de defeitos segmentares associado ao tratamento com teriparatida nas doses diárias de 30 e 40 µg/kg;
- Quantificar a neoformação óssea na interface entre o enxerto e o osso hospedeiro em animais tratados com teriparatida nas doses diárias de 30 e 40 µg/kg/dia;
- Avaliar a neoformação óssea no interior do aloenxerto em animais tratados com teriparatida nas doses diárias de 30 e 40 µg/kg;
- Avaliar a frequência de células osteoprogenitoras na medula óssea de animais tratados com teriparatida nas doses diárias de 30 e 40 µg/kg.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo trinta e cinco camundongos machos C57BL/6 com idade entre 13-16 semanas, obtidos do biotério Granja R.G. (Suzano, SP). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad no Rio de Janeiro (INTO/MS) sob o registro nº 002_2014.

3.2 Modelo *in vivo*

Para o modelo *in vivo* foram utilizados 27 animais. As etapas do desenho experimental do estudo *in vivo* estão descritas em sequência temporal na Figura 3-1.

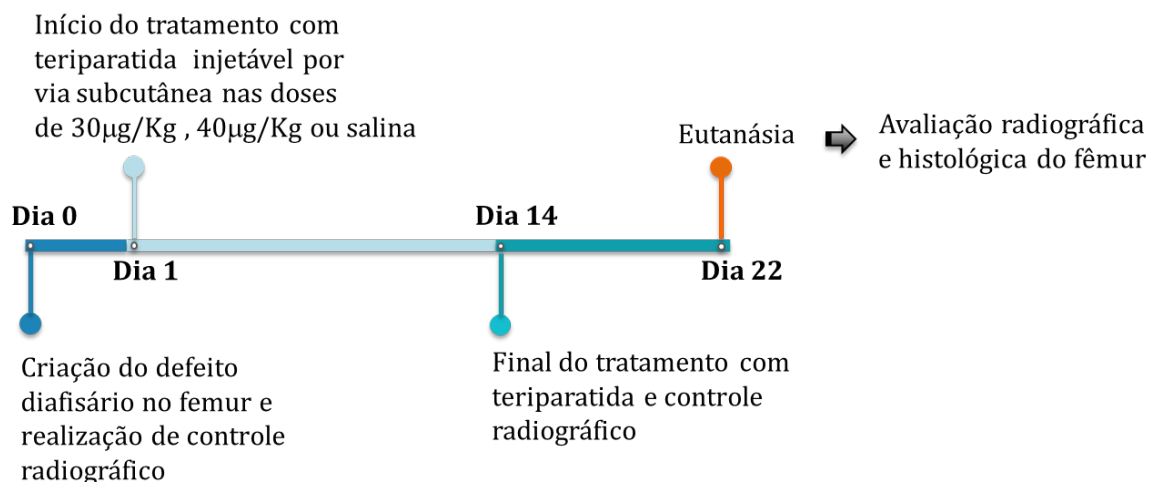


Figura 3-1: Linha temporal do desenho experimental *in vivo*.

3.2.1 Procedimento cirúrgico: anestesia e analgesia

Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (Dopalen, CEVA, 100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Anasedan, CEVA, 10 mg/kg). A analgesia foi realizada com 2 mg/kg de cetoprofeno 1% (Vencofarma) por via subcutânea no período pré-operatório e mantido por dois dias consecutivos no pós-operatório. A antibioticoterapia profilática foi realizada com 50 mg/kg de clindamicina em dose única por via subcutânea. Os animais foram mantidos anestesiados durante todo o procedimento cirúrgico.

3.2.2 Fixação da placa e criação do defeito segmentar

As cirurgias foram realizadas em ambiente estéril, com o animal posicionado em decúbito ventral, sobre cama térmica aquecida a 37°C. Após a tricotomia e antissepsia do membro posterior esquerdo com álcool 70%, foi realizada incisão cutânea longitudinal na face lateral da coxa, se estendendo do grande trocanter até o côndilo lateral do fêmur (Figura 3-2A). Após a incisão da fáscia lata, identificação e isolamento do nervo ciático, o músculo vasto lateral e bíceps femoral foram divulsionados para exposição do fêmur em toda a sua extensão (Figura 3-2B). A seguir, foi posicionada sobre a superfície anterior do fêmur uma placa de titânio com seis furos microbloqueada (10 mm comprimento e 1,5 mm largura; MouseFix Plate XL; RISystem AG) com auxílio de uma pinça hemostática reta (Figura 3-2C).

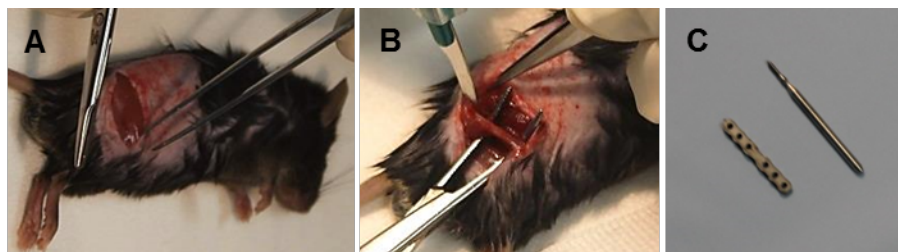


Figura 3-2: Acesso cirúrgico e material de síntese. (A) Acesso cutâneo sobre a face lateral da coxa. (B) Exposição do fêmur após a incisão da fáscia lata e divulsão dos músculos vasto lateral e bíceps femoral. (C) Material de síntese: parafuso de fixação bloqueado e placa de titânio com seis furos.

Para a fixação da placa no fêmur, foram utilizados parafusos de fixação bloqueados (2 mm de comprimento, 0,47 mm de diâmetro externo e 0,34 mm de diâmetro interno; MouseFix Screw 2 mm; RISystem AG) através de torções completas da haste (Figura 3-2C). Os parafusos foram fixados sempre na mesma ordem, iniciando nos orifícios das extremidades distal e proximal da placa (posições 1 e 6, respectivamente) seguido dos parafusos nas posições 2 e 5. Os orifícios correspondentes as posições 3 e 4 permaneceram sem parafusos.

3.2.3 Reconstrução do defeito com enxerto ósseo alogênico

Uma vez obtida fixação da placa com quatro parafusos (posições 1, 6, 2 e 5) (Figura 3-3A) foi realizada ostectomia com o auxílio de serra de Gigli (0,22 mm; RISystem AG) (Figura 3-3B) utilizando os dois orifícios centrais da placa (posições 3 e 4) como referência para criação do defeito, com cerca de 2,5-3,0 mm de comprimento, na porção central da diáfise femoral (Figura 3-3C). Os segmentos femorais retirados para a produção do defeito ósseo foram processados e utilizados como enxerto alogênico. O processamento foi feito em condições estéreis imediatamente após a

retirada durante o ato cirúrgico, e consistiu inicialmente de lavagem com solução salina 0,9% até a total remoção de gotículas de gordura e de hemácias na cavidade medular. A seguir, todos os tecidos aderidos às superfícies ósseas, incluindo o perióstio e o endóstio foram completamente retirados. Numa etapa subsequente os enxertos foram mantidos por 20 minutos em solução 11mg/mL de cloridrato de vancomicina e em solução salina a 0,9% por 20 minutos adicionais. A criopreservação foi feita a -70° C por no mínimo 12 horas e o descongelamento foi feito em solução salina 0,9% em temperatura ambiente no momento da utilização no procedimento cirúrgico.

Para a reconstrução do defeito, os enxertos foram posicionados no local da lesão e mantidos na posição através de uma cerclagem realizada com fio de sutura absorvível de poliglactina (Vicryl 4-0, Ethicon) englobando o enxerto e a placa de titânio já fixada na superfície do fêmur (Figura 3-3D). A seguir foi feito o fechamento da fáscia e do subcutâneo com pontos simples interrompidos com fio absorvível de poliglactina (Vicryl 4-0, Ethicon). O fechamento da pele foi feito com pontos simples interrompidos com fio de nylon 4-0 (NylPoint). Em dois animais foi realizada a osteosíntese sem a reconstrução dos defeitos com o enxerto alogênico, para comprovação do modelo experimental de defeito ósseo segmentar, isto é, que não ocorreria a consolidação espontânea do defeito.

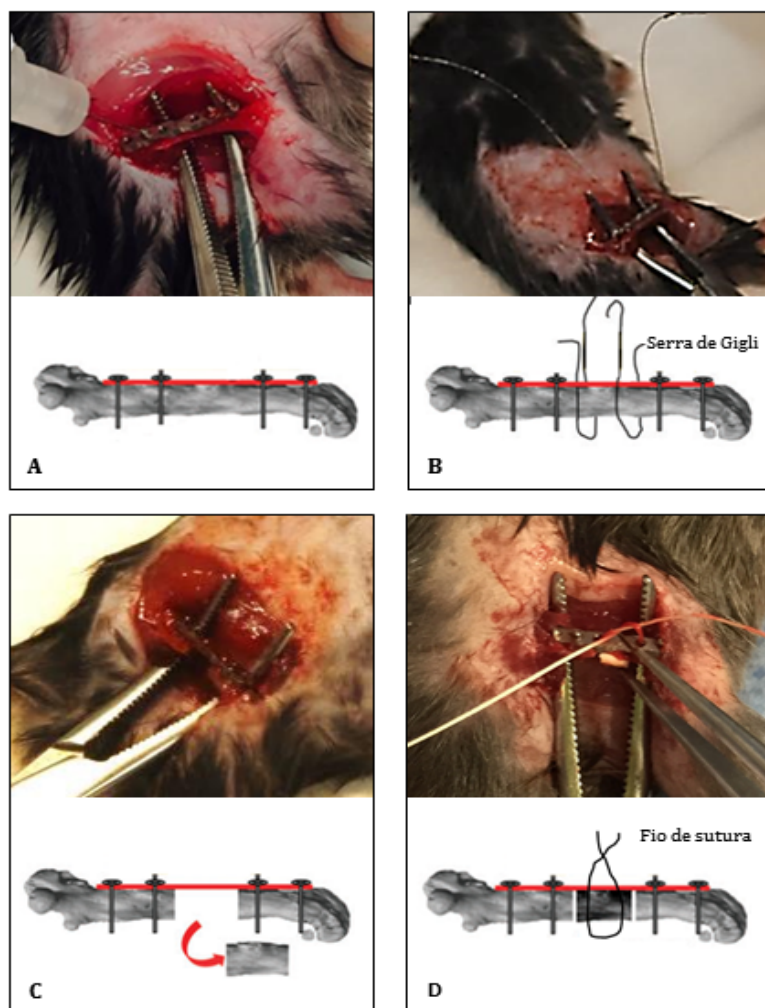


Figura 3-3: Tempos cirúrgicos para a criação e reconstrução do defeito ósseo. (A) Posicionamento e fixação da placa na superfície anterior do fêmur com parafusos bloqueados. (B) Osteotomia realizada com serra de Gigli utilizando como referência os orifícios da placa nas posições 3 e 4. (C) Retirada da porção central da diáfise femoral e criação do defeito ósseo com 2,5-3 mm. (D) Reconstrução do defeito com enxerto alógeno mantido posicionado através de cerclagem realizada com fio de sutura reabsorvível.

3.2.4 Pós-operatório

Após a cirurgia os animais foram mantidos individualmente em microisoladores com enriquecimento ambiental e com livre acesso à água e ração comercial autoclavada (Nuvilab CR1-Nuvital). Os animais foram observados diariamente para avaliação da ferida operatória quanto à presença de secreções,

deiscência de sutura, edema e evolução do processo de cicatrização da pele. Também foram avaliadas alterações comportamentais, qualidade da deambulação, aspecto geral, vocalização e perda de apetite.

3.3 Tratamento com teriparatida

Vinte e quatro horas após a cirurgia, vinte e sete animais foram distribuídos aleatoriamente nos três grupos de tratamento. Nove animais foram tratados com injeções subcutâneas diárias de PTH₁₋₃₄ (Fortéo, Lilly, Fergersheim, França)¹ na dose de 30 µg/kg (PTH 30), nove animais foram tratados com 40 µg/kg (PTH 40) e nove animais com injeções subcutâneas diárias de solução salina 0,9% (salina). As injeções foram realizadas sem interrupção durante quatorze dias.

3.4 Análise radiográfica

Imediatamente após a cirurgia os animais foram submetidos ao primeiro controle radiográfico para avaliar o tamanho do defeito e o posicionamento dos enxertos na diáfise femoral. A análise foi feita em radiografias convencionais nas incidências em perfil e anteroposterior do membro posterior esquerdo. O tamanho do defeito foi medido utilizando-se o programa de processamento de imagem radiográfica (mDicomViewer, Microdata versão 3.0). O segundo exame radiográfico foi feito no final do tratamento com a teriparatida (15º dia de pós-operatório) e no dia da eutanásia, sete dias após o término do tratamento com a teriparatida (22º dia de pós-operatório). O exame no 15º dia foi realizado com os animais sob sedação leve (xilazina 10mg/kg por via intraperitoneal).

¹ PTH₁₋₃₄ ou Fortéo ou teriparatida é derivada de DNA recombinante humano, apresentada sob a forma de solução estéril, isotônica, contendo 250µg de teriparatida por mL.

3.5 Análise Histológica

Após a eutanásia no 22º dia de pós-operatório, com sobredose de quetamina associada à xilazina, o membro inferior esquerdo foi desarticulado no quadril e o fêmur esquerdo foi cuidadosamente retirado. Após a remoção dos tecidos moles e exposição da face anterior do osso, a placa e os parafusos foram cuidadosamente retirados de forma a manter inabalada a zona de contato entre o enxerto e o osso hospedeiro. A seguir, o fêmur foi fixado por 48 horas em formaldeído tamponado a 10% (pH 7,4), descalcificado em ácido nítrico a 5% durante 40 minutos e, em seguida, lavado em água corrente por 2 horas. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes longitudinais do fêmur com 5 µm de espessura, que foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H&E).

As lâminas contendo as amostras foram escaneadas no sistema Aperio (Leica Biosystems) para a aquisição das imagens histológicas e digitalizadas no programa de análise ImageScope (Leica Biosystems).

3.5.1 Avaliação da consolidação do enxerto

A consolidação óssea foi avaliada nas extremidades distal e proximal do osso hospedeiro com o enxerto, totalizando em cada animal, quatro zonas de contato entre as corticais (Figura 3-4).

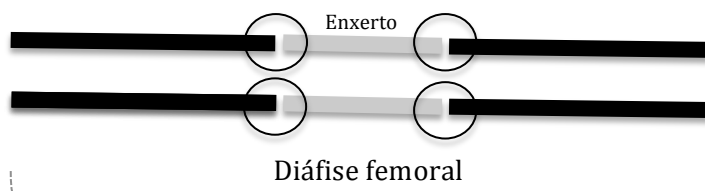


Figura 3-4: Diagrama ilustrando os pontos de avaliação da consolidação óssea nas interfaces entre o osso hospedeiro e o enxerto allogênico.

O diagnóstico de união foi feito quando havia continuidade óssea diretamente entre as corticais e/ou união óssea endosteal e/ou periosteal. O diagnóstico de não-união foi feito quando não havia continuidade óssea entre as corticais pela interposição de tecido conjuntivo entre elas. Foram excluídas da análise e descontadas da contagem geral as interfaces que não foram identificadas no corte histológico e/ou não permitiam o diagnóstico de certeza de consolidação por artefatos técnicos no corte histológico.

3.5.2 Análise histomorfométrica

3.5.2.1 Revitalização do enxerto

A revitalização do enxerto foi avaliada através da quantificação do volume de osso neoformado na cavidade medular. Em imagens representativas de toda a extensão da cavidade medular do enxerto foram quantificadas as áreas de neoformação óssea utilizando o programa Image J (Wayne Rasband, NIH, v.1.49). Com o auxílio da ferramenta *straight line*, as medições foram calibradas de acordo com o tamanho correspondente à barra de escala da microfotografia. Dessa forma, foi estabelecida a proporção de pixels em micrômetros. A área total da cavidade medular do enxerto e o volume de osso neoformado foram medidos através da delimitação

manual com a ferramenta de seleção *freehand*. O volume total de osso neoformado na cavidade medular do enxerto foi calculado através da totalização das áreas de neoformação óssea e expresso em valor percentual (média $\pm$ desvio padrão) em relação à área total da cavidade medular do enxerto.

3.5.2.2 Neoformação óssea nas corticais consolidadas

O volume de osso neoformado na interface do enxerto com o osso hospedeiro foi quantificado nas extremidades consolidadas como forma de avaliar, indiretamente, a atividade celular no processo de consolidação. Nesta quantificação foi utilizando como parâmetro, regiões de interesse (*region of interest*, ROI) definidas a partir da extremidade da cortical do enxerto. Nas imagens histológicas foi traçado um quadrado na região de interesse (ROI) com 1 mm² utilizando como referência para o centro do quadrado a borda da cortical do enxerto (Figura 3-5). O volume de osso neoformado na ROI foi calculado utilizando a metodologia descrita para a avaliação da revitalização do enxerto e expresso em mm³ (média $\pm$ desvio padrão).

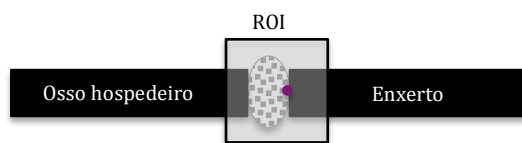


Figura 3-5: Esquema ilustrativo da região de interesse (ROI). O volume de osso neoformado (pontilhado) entre as corticais do enxerto e do osso hospedeiro foi quantificado na ROI (quadrado cinza) utilizando como referência para definir o centro do quadrado a extremidade da cortical do enxerto (ponto vermelho) e expresso em mm³. Apenas o osso neoformado foi incluído na medição.

3.6 Modelo *in vitro*

Para o modelo *in vitro* foram utilizados seis animais. As etapas do desenho experimental do estudo *in vitro* estão descritas em sequência temporal na Figura 3-6.

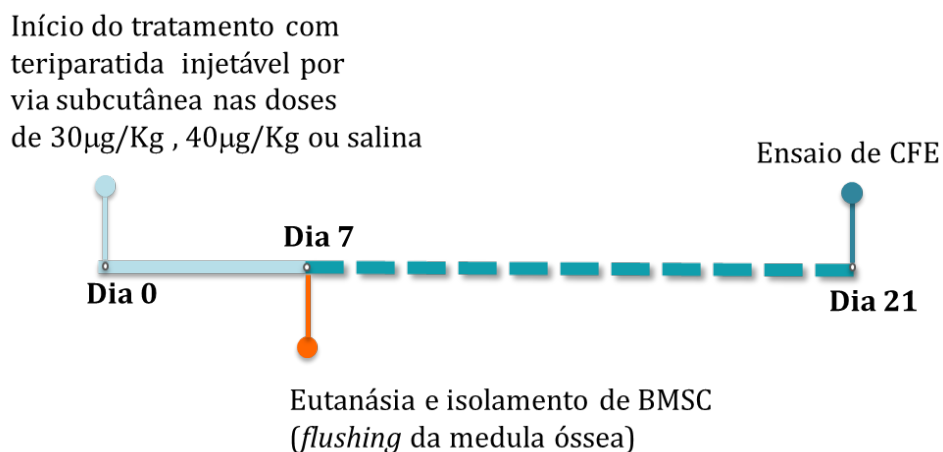


Figura 3-6: Linha temporal do desenho experimental *in vitro*.

3.6.1 Isolamento de células estromais da medula óssea e ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE)

Para avaliar a ação da teriparatida sobre a frequência de progenitores estromais na medula óssea, dois animais foram tratados com injeções subcutâneas diárias de teriparatida na dose de 30 µg/kg (PTH 30), dois animais foram tratados com 40 µg/kg (PTH 40) e dois animais com injeções subcutâneas diárias de solução salina 0,9% (salina). Após o tratamento por sete dias sem interrupção, os animais foram eutanasiados com sobredose de ketamina e xilazina. As condições de acondicionamento, acesso e tipo de alimentação foram as mesmas dos animais do modelo *in vivo*.

Em ambiente estéril, as células estromais (*bone marrow stromal cells*, BMSC) foram isoladas da medula óssea por lavagens sucessivas (*flushing*) da cavidade medular de ambos os fêmures com α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, EUA). Após centrifugação (200 *g* por 5 min) e diluição em solução de Turk (ácido acético a 2%) o quantitativo total de células nucleadas foi determinado em câmara de Neubauer em microscópio óptico invertido (Nikon TS100). A seguir as células nucleadas foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células/cm² em frascos de cultura de 25cm² em 5 mL de α -MEM suplementado com 10% de SFB e 10 μ g/mL de ciprofloxacina (Fresenius Kabi, Barueri, SP, Brasil), durante 3 dias, em incubadora de CO₂ a 5% e a 37°C. Após este período, as células hematopoéticas não aderentes foram removidas mediante lavagem em solução salina tamponada (PBS, *phosphate buffer saline*), com troca do meio de cultivo. As culturas foram mantidas durante mais onze dias quando, então, as colônias foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução aquosa saturada de cristal violeta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após secagem à temperatura ambiente, foi realizada a contagem manual das colônias e a medição dos seus diâmetros (expresso em milímetros). O número de células de cada colônia foi contado em microscópio óptico invertido (Nikon, TS 100) e na quantificação final foram incluídas apenas as colônias com mais de 50 células.

3.7 Análise Estatística

Todos os valores numéricos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As comparações entre os grupos salina, PTH 30 e PTH 40 foram realizadas por One-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. Os resultados categóricos foram expressos sob a forma de frequência e percentual e avaliados pelo teste exato de Fisher. O intervalo de confiança de 95% foi considerado como estatisticamente significativo. A análise de significância estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 7.

4 RESULTADOS

4.1 Modelo *in vivo*

4.1.1 Aspectos intra e peri-operatórios

O procedimento cirúrgico, da indução anestésica ao fechamento da ferida operatória, em geral teve a duração de 45 a 60 minutos. A osteosíntese foi realizada com auxílio de lupa e as principais complicações intra e peri-operatórias foram relacionadas com o procedimento anestésico (parada cardio-respiratória), fratura do fêmur durante a manipulação para a realização da osteosíntese e hipotermia, apesar do uso da cama térmica.

Na análise radiográfica realizada imediatamente após o término da cirurgia foi confirmado, que em todos os animais, a placa e os parafusos foram posicionados corretamente e que os enxertos estavam alinhados anatomicamente na porção medial da diáfise do fêmur.

4.1.2 Evolução clínica

Todos os animais deambularam livremente após o despertar da anestesia. Nos primeiros dias de pós-operatório apresentavam alguma dificuldade em utilizar o membro operado. Após uma semana a marcha se normalizou e o desempenho passou a ser o mesmo observado antes da cirurgia. Alguns animais apresentaram deiscência de sutura, que além de retardar em alguns dias a cicatrização da ferida, não interferiu no procedimento ortopédico e não necessitou de cuidados adicionais. Três animais (11%) evoluíram para o óbito (dois no grupo controle e um no grupo PTH 40), provavelmente por causas relacionadas com o estresse cirúrgico que resultaram em

queda acentuada do estado geral. Nenhum animal apresentou reações locais ou sistêmicas relacionadas com o tratamento com teriparatida por via subcutânea nas doses de 30 e 40 µg/kg/dia.

4.1.3 Avaliação radiográfica do defeito

O tamanho médio do defeito diafisário foi similar entre os grupos experimentais PTH 30 ($2,7 \pm 0,4$ mm), PTH 40 ($3,1 \pm 0,5$ mm) e controle ($2,5 \pm 0,4$ mm) (Figura 4-1).

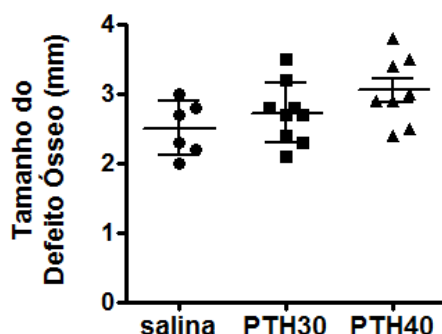


Figura 4-1: Tamanho do defeito na porção central da diáfise femoral. Dados representados como média $\pm$ desvio padrão. $p = 0,9$.

Os dois animais que não utilizaram enxerto na reconstrução da falha óssea permaneceram com o local do defeito sem evidência de formação óssea até o final do experimento (Figura 4-2).

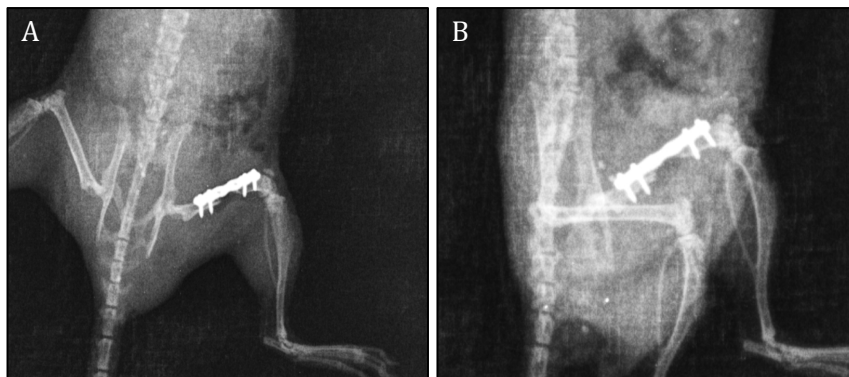


Figura 4-2: Radiografias simples do fêmur esquerdo 21 dias após a ostectomia sem enxertia. Incidências em (A) anteroposterior e (B) perfil confirmando a ausência consolidação espontânea e permanência do defeito vazio.

Na avaliação feita no pós-operatório imediato, todos os animais incluídos no estudo apresentavam fixação estável do implante e alinhamento anatômico do enxerto na porção central da diáfise femoral. As interfaces do enxerto com o osso hospedeiro foram identificadas por linhas radiotransparentes (*gaps*) (Figura 4-3).



Figura 4-3: Radiografia do fêmur esquerdo realizada no pós-operatório imediato. A placa e os parafusos estão corretamente posicionados e o enxerto está alinhado no defeito. Presença de linhas radiotransparentes (*gaps*) nas interfaces do enxerto com o osso hospedeiro (setas).

Na avaliação intermediária realizada no 14º dia de pós-operatório e na avaliação final no dia da eutanásia, os achados radiográficos foram similares entre os animais dos três grupos. A fixação dos implantes se manteve estável em todos os animais e os enxertos mostravam continuidade com o osso hospedeiro (Figura 4-4). Um animal do grupo controle (salina) apresentou reabsorção completa do enxerto.

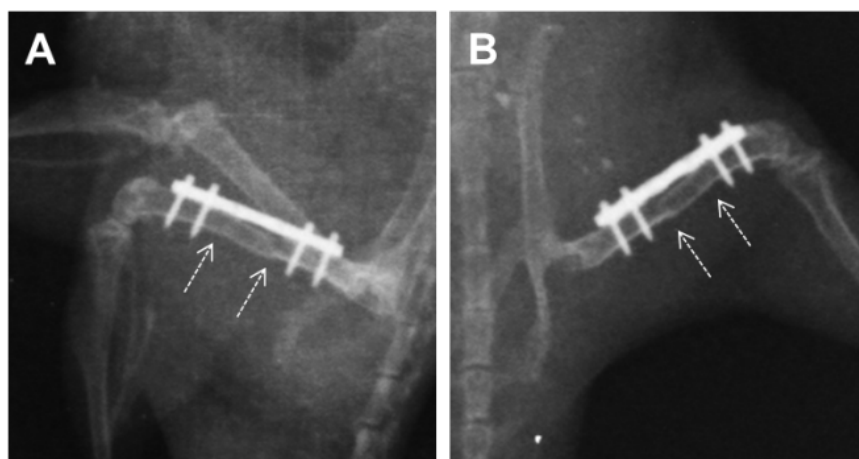


Figura 4-4: Radiografias simples mostrando consolidação do enxerto. Incidências em (A) perfil e (B) anteroposterior do fêmur esquerdo. As setas indicam as interfaces do osso hospedeiro com o enxerto.

4.1.4 Avaliação histológica da consolidação do enxerto

A amostra inicial constituída por 27 animais (nove em cada grupo) foi reduzida para 23 animais pelas perdas por óbito durante o pós-operatório (dois animais do grupo salina e um animal do grupo PTH 40) e pela reabsorção do enxerto em um animal do grupo salina.

A avaliação histológica da consolidação do enxerto revelou que no grupo experimental PTH 30 (n=9), 67% (16/24) das corticais estavam consolidadas. No grupo PTH 40 (n=8) o diagnóstico de união foi feito em 43% (13/30) das corticais e

no grupo controle tratado com salina (n=6) em 72% (13/18). Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos dos percentuais de consolidação dos enxertos (Tabela 1).

Tabela 1. Índices de consolidação dos enxertos nos três grupos experimentais.

Tratamento	União	<i>p</i> valor *
Salina	72% (13/18)	Salina vs PTH 30: 0,74
PTH 30	67% (16/24)	Salina vs PTH 40: 0,07
PTH 40	43% (13/30)	PTH 30 vs PTH 40: 0,10

* Teste exato de Fisher

4.1.5 Avaliação histomorfométrica da revitalização do enxerto

A revitalização dos enxertos alogênicos, avaliada através do percentual da extensão da cavidade medular ocupada por osso mineralizado neoformado, foi maior nos animais PTH 30 ($13,7 \pm 4,6\%$) em relação aos animais do grupo controle ($7 \pm 3,7\%$). Nos animais PTH 40 não houve diferença estatisticamente significativa do percentual de formação óssea ($8,7 \pm 4,8\%$) em relação ao grupo controle (Figura 4-5).

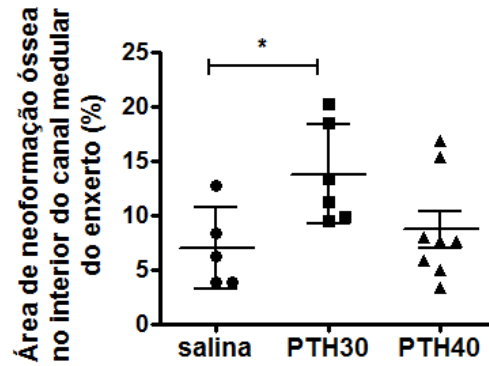


Figura 4-5: Neoformação óssea na cavidade medular do enxerto. Dados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p=0,03$.

Nos animais PTH 30, a neoformação óssea no interior do enxerto, além de promover o preenchimento da cavidade medular, reproduziu a microarquitetura normal do osso esponjoso com o padrão de traves ósseas interconectadas relacionadas com medula óssea hematopoética (Figura 4-6).

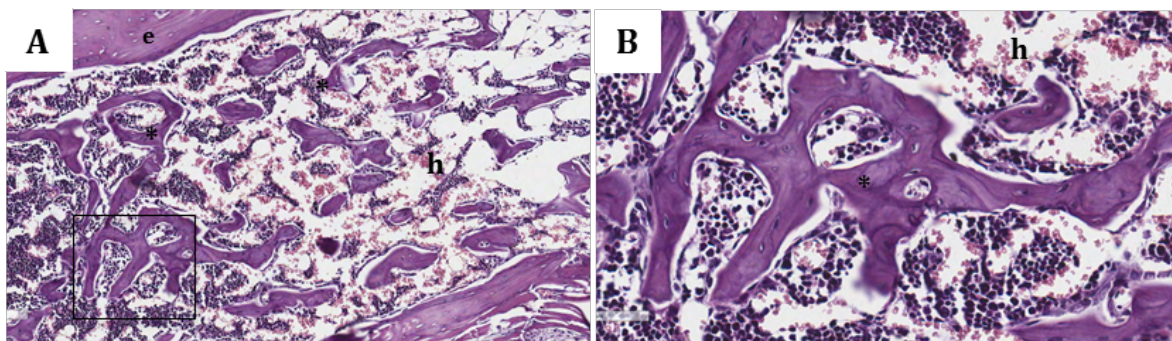


Figura 4-6: Porção central da cavidade medular de enxerto de animal do grupo PTH 30. (A) Neoformação óssea promoveu o preenchimento completo do enxerto. (B) Osso neoformado reproduz morfologia do osso esponjoso, com traves ósseas interconectadas (*) relacionadas com medula óssea hematopoética (h). A região assinalada no *inset* na figura A está ilustrada em detalhe nas figuras B. e=enxerto.

Nos animais PTH 40, a neoformação óssea foi menor do que nos animais PTH 30 e insuficiente para promover a integração completa do enxerto com o osso hospedeiro (Figura 4-7).

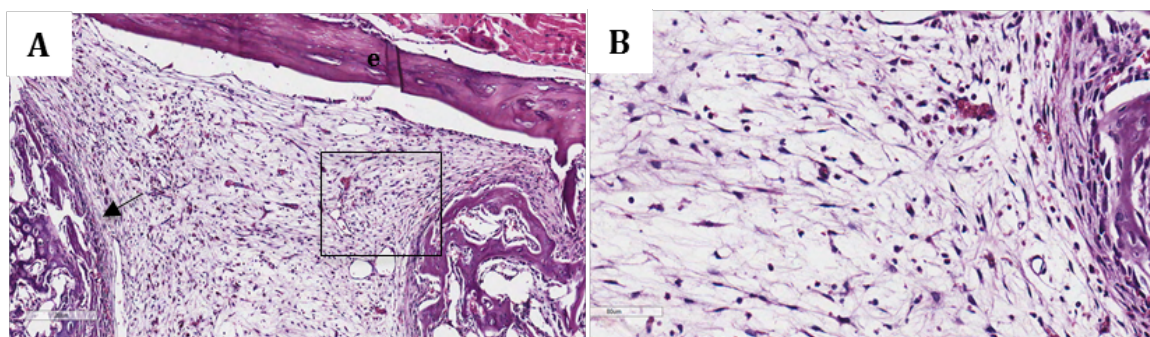


Figura 4-7: Porção central da cavidade medular de enxerto de animal do grupo PTH 40. (A) Neoformação óssea originada das bordas corticais da osteotomia (seta), não preenche o enxerto completamente. (B) A porção central da cavidade medular do enxerto está preenchida por tecido conjuntivo frouxo não osteogênico. A região assinalada no *inset* na figura A está ilustrada em detalhe nas figuras B. e=enxerto.

Nos animais do grupo controle à semelhança dos animais PTH40, além da menor neoformação óssea em relação aos animais PTH 30, a porção interna dos enxertos é preenchida em quase sua totalidade por tecido conjuntivo frouxo vascularizado sem evidências de potencial osteogênico.

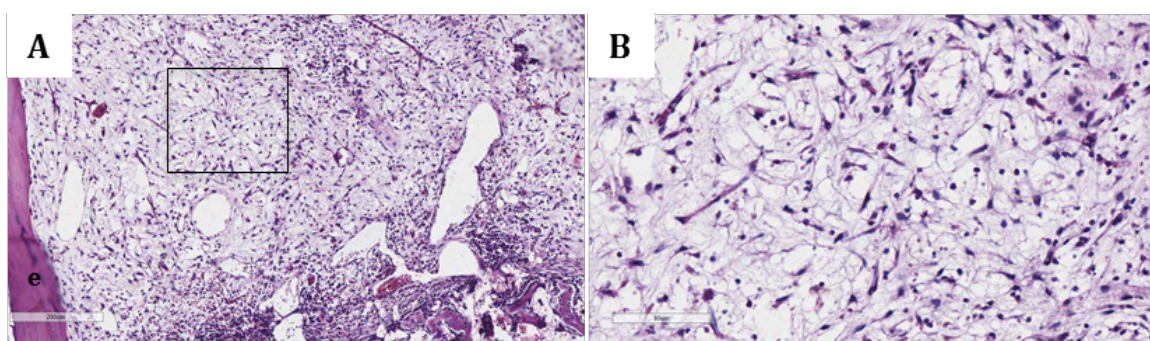


Figura 4-8: Porção central da cavidade medular de enxerto de animal do grupo salina. (A) Ausência de neoformação óssea na cavidade medular do enxerto. (B) A porção central do enxerto está completamente preenchida por tecido conjuntivo frouxo não osteogênico. A região assinalada no *inset* na figura A está ilustrada em detalhe nas figuras B. e=enxerto.

4.1.6 Avaliação histomorfométrica das interfaces consolidadas

O volume de osso neoformado nas interfaces enxerto-hospedeiro nas corticais consolidadas foi maior nos animais PTH 30 ($0,06 \pm 0,02 \text{ mm}^3$) tanto em relação aos animais do grupo controle ($0,043 \pm 0,015 \text{ mm}^3$) como em relação aos animais PTH 40 ($0,045 \pm 0,02 \text{ mm}^3$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o volume de osso neoformado nas corticais consolidadas dos animais PTH 40 e controle (Figuras 4-9 e 4-10).

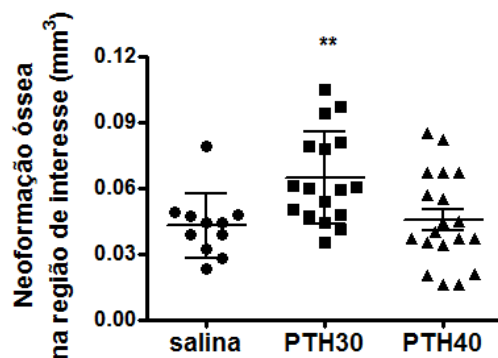


Figura 4-9: Neoformação óssea nas corticais consolidadas. Dados representados como média $\pm$ desvio padrão. **p= 0,007.

Apesar dos índices de consolidação ser semelhante entre os três grupos de animais, no grupo PTH 30 a integração das corticais consolidadas envolvia maior volume de osso neoformado que, quase sempre apresentava extensão endosteal e/ou periosteal (Figura 4-10 A). Por outro lado, nos animais dos grupos PTH 40 e salina a formação óssea é menor e mais restrita a zona de contato entre as corticais (Figura 4-10 B e C).

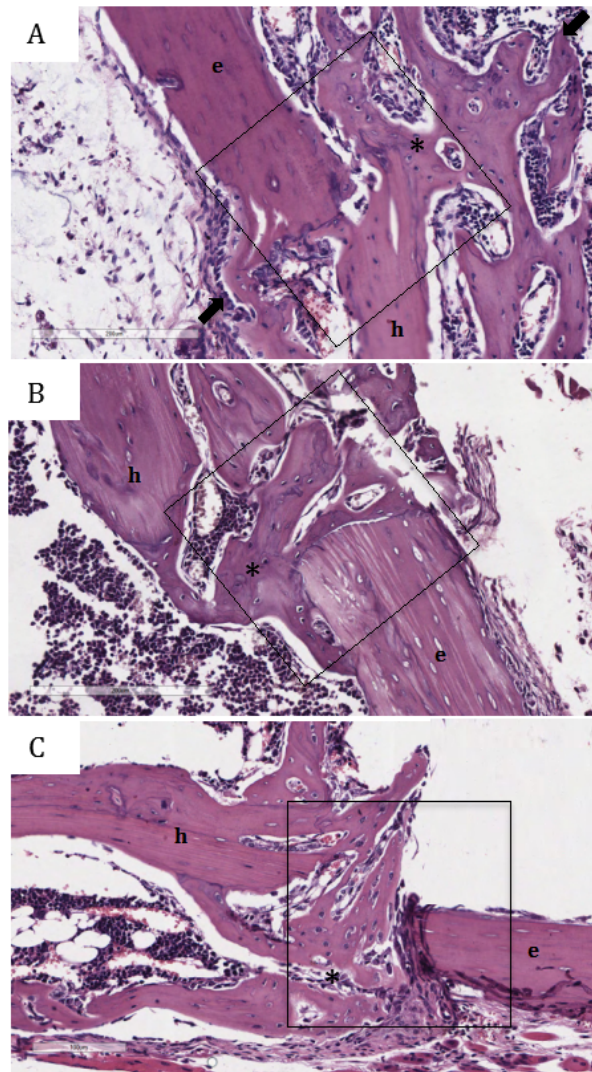


Figura 4-10: Quantificação da neoformação óssea nas interfaces consolidadas. (A) Consolidação em animal PTH 30 com extensão da formação óssea para região endosteal (*) e periosteal (p). (B) Consolidação em animal PTH 40 com pequena extensão da formação óssea para a cavidade medular através da superfície endosteal (*). (C) Consolidação em animal do grupo controle (salina) com aspecto semelhante ao animal PTH 40 (menor formação óssea, mais restrita a zona de contato entre as duas corticais). h= osso hospedeiro; e= enxerto

4.2 Modelo *in vitro*

4.2.1 Frequência de progenitores estromais da medula óssea em animais tratados com teriparatida

A morfologia das células aderentes com característica fibroblastóide, o diâmetro das colônias (salina: $19,5 \pm 7,8$; PTH 30: 29 ± 10 e PTH 40: $7 \pm 2,8$, $p=0,13$) e o número de colônias (salina: $0,16 \pm 0,04$; PTH 30: $0,19 \pm 0,03$ e PTH 40: $0,18 \pm 0,02$ mm, $p=0,5$) foram similares nos três grupos de animais, indicando não haver diferenças em relação ao potencial clonogênico dos progenitores mesenquimais isolados dos grupos experimentais e do grupo controle (Figura 4-11).

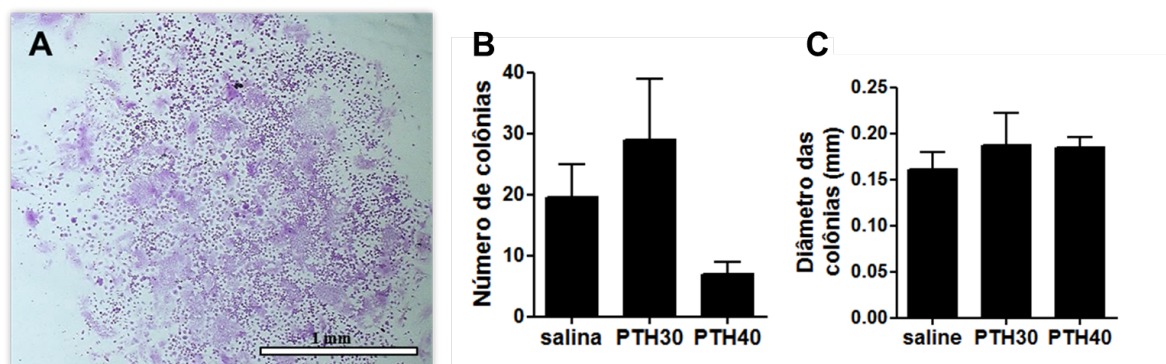


Figura 4-11. Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides (CFE) em animais tratados com teriparatida ou salina. A exposição ao PTH1-34 não aumentou a frequência de células estromais derivadas da medula óssea. As barras representam a média do número de colônias $\pm$ desvio padrão em cada grupo animal. $p=0,13$ para número de colônias; $p=0,5$ para o diâmetro das colônias.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento e validação do modelo murino de defeito ósseo segmentar crítico

A maioria dos modelos animais pré-clínicos publicados são pouco definidos ou pobremente descritos. Em 2008 o *Journal of Bone and Joint Surgery* publicou alguns artigos de revisão sobre modelos animais para o estudo da consolidação óssea, porém apenas informação rudimentar em como estabelecer um modelo de falha segmentar foi apresentado (O'LOUGHLIN *et al.*, 2008).

Para reproduzir um modelo experimental que tenha como objetivo avaliar medidas terapêuticas para potencializar a consolidação e incorporação de enxertos ósseos alogênicos em defeitos segmentares é necessário que este modelo preencha alguns requisitos. Inicialmente é necessário que o enxerto seja mantido em condições de estabilidade biomecânica durante todo o processo de reparo ósseo (GARRIDO *et al.*, 2011). Nosso modelo de falha óssea foi criado para reproduzir experimentalmente as dificuldades que encontramos na prática clínica ao lidar com esse tipo de condição. Einhorn, em 1999, postulou que uma lesão traumática experimental, criada para o estudo da consolidação óssea necessita ter uma dimensão tal que impeça a cicatrização espontânea. Dessa forma o termo “crítico” transmite a ideia de um limiar não regenerável para defeitos ósseos criados em ambiente experimental. Outra característica que o modelo deve apresentar, para confirmar a situação de defeito de tamanho crítico, é ausência de formação de calo e de consolidação espontânea nos defeitos que não são reconstituídos (SCHWEIBERER *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2004; OETGEN *et al.*, 2008).

Em murinos, o fêmur é o local de escolha para a realização dos defeitos segmentares tanto pela sua geometria tubular uniforme (diâmetro de 1,5 mm) como pela sua dimensão (12 mm). Nesta localização é possível realizar um defeito com cerca de 25% do comprimento do fêmur e duas vezes o tamanho do diâmetro da diáfise. Da mesma forma como na situação clínica, a osteossíntese com placa bloqueada em camundongos fornece estabilização adequada à reconstrução de defeitos ósseos segmentares em osso submetido à carga (MANASSERO *et al.*, 2013).

A escolha e adequação do modelo aos objetivos do estudo foram confirmadas pela reprodutibilidade dos nossos resultados. O material de síntese utilizado permitiu o posicionamento da placa com precisão possibilitando a criação de defeitos com o mesmo tamanho. Outro ponto positivo deste tipo de implante foi a estabilidade da fixação. Se considerarmos que a formação de calo endocondral é uma forma indireta de avaliar movimento interfragmentário, a ausência de cartilagem nas amostras que foram analisadas confirma que este tipo de síntese reproduz uma fixação estável.

Uma opção para a osteossíntese com placa e parafusos é a fixação com haste intramedular. As principais vantagens do uso da haste são a maior facilidade técnica para sua colocação e a menor agressividade do procedimento cirúrgico. Por outro lado, a fixação com placa evita lesões iatrogênicas da cartilagem articular que pode acarretar em claudicação e dificuldade para sustentar carga (TIYAPATANAPUTI *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2011).

A nossa opção pela fixação com placa e parafusos teve como principal motivação a preservação da medula óssea, que permitiu a análise da extensão da revitalização do enxerto alogênico através da quantificação do volume de osso

neoformado no canal medular. Além disso, a fixação estável garantiu, em todos os animais, as mesmas condições biomecânicas para que ocorresse consolidação, eliminando variáveis como formação de calo endocondral de diferentes tamanhos e com diferentes tempos de maturação. Nenhum dos animais durante o experimento evoluiu com falha da síntese.

Outra vantagem da fixação estável foi a manutenção do enxerto posicionado no defeito durante todo o período experimental. Na nossa experiência com o modelo, a inclusão na técnica cirúrgica original (MANASSERO *et al.*, 2013) de uma cerclagem com fio de sutura englobando a placa e o enxerto, auxiliou na permanência dos enxertos posicionados anatomicamente no local do defeito. Por fim, essa estabilização óssea permitiu que os animais fossem submetidos à manipulação diária durante duas semanas sem que isso acarretasse em afrouxamento dos parafusos e nem deslocamento dos enxertos.

Excluindo os três animais que evoluíram para o óbito no pós-operatório, de causas relacionadas possivelmente com o estresse cirúrgico, os demais animais se recuperaram rapidamente, sem intercorrências. Este percentual de mortalidade (11%) está próximo os índices considerados aceitáveis (5% a 10%) para experimentos em animais de pequeno porte com modelos de doenças ortopédicas (AUER *et al.*, 2007).

5.2 Ações do PTH₁₋₃₄ sobre a incorporação de aloenxertos estruturais

Em humanos, a teriparatida (PTH₁₋₃₄) promove aumento da massa óssea e redução dos índices de fraturas em ossos osteoporóticos e, por esta ação, é indicada

para o tratamento de osteoporose (NEER *et al.*, 2001). Na última década, um número crescente de relatos propõe ampliar o uso do PTH₁₋₃₄ como terapia adjuvante para acelerar a consolidação de fraturas. A maior parte dessas propostas se baseia em resultados de séries e de relatos de casos em pacientes com fraturas recentes ou com retarde de consolidação que, em resposta ao tratamento com PTH₁₋₃₄, evoluíram com formação de maior calo ósseo, aumento do conteúdo mineral ósseo e maiores índices de consolidação. Entretanto, poucas evidências são baseadas em estudos clínicos randomizados controlados a fim de assegurar os benefícios do tratamento com PTH₁₋₃₄ no contexto do trauma ortopédico (BHANDARI *et al.*, 2016)

Apesar das limitações para reproduzir em modelo animal de pequeno porte o tamanho de um defeito segmentar e a biomecânica humana, a comprovação da ação osteoanabólica do PTH₁₋₃₄ em humanos ainda é altamente dependente de resultados obtidos em modelos animais, em particular os mecanismos celulares e moleculares que regulam a consolidação óssea (HISTING *et al.*, 2011).

Os relatos pioneiros de ANDREASSEN e colaboradores (1999) e HOLZER e colaboradores (1999) mostraram em um modelo de fratura em tíbia de ratos que o PTH₁₋₃₄ proporcionava aumento da formação óssea e da qualidade do calo para resistir à carga. Entretanto, variáveis como o momento ideal para iniciar a administração de PTH₁₋₃₄, a duração e a dose do tratamento favorecendo a janela anabólica, ainda permanecem indefinidas na literatura.

No presente estudo, o tratamento com 30 µg/kg PTH₁₋₃₄ iniciado no dia seguinte da cirurgia e mantido ininterruptamente durante 14 dias resultou em expressiva neoformação óssea no canal medular do enxerto. Considerando que no

cenário clínico a revitalização do enxerto está necessariamente associada ao sucesso do tratamento de falhas segmentares com enxertia alogênica, nossos resultados favorecem a hipótese de que, nessas circunstâncias, o PTH₁₋₃₄ atue favoravelmente sobre a osteogênese resultando na revitalização precoce de enxertos ósseos desvitalizados.

A ação potencializadora do PTH₁₋₃₄ sobre a osteogênese foi comprovada em outras situações ortopédicas tais como na osteointegração de componentes protéticos (DAUGAARD *et al.*, 2012), na fixação de implantes (DAUGAARD *et al.*, 2011) e sobre o volume de osso formado na superfície (FAHLGREN *et al.*, 2013) ou no interior (JACOBSON *et al.*, 2011) de implantes. Se confirmados em humanos, esses resultados passam a ter importante significado clínico, por resultarem na integração precoce de enxertos e implantes em geral.

Apesar de os enxertos estruturais serem a principal opção para reconstruir grandes perdas ósseas, a sua utilização está relacionada com altas taxas de não união (27-34%) e fratura (24-27%) (BRIGMAN *et al.*, 2004; WHEELER e ENNEKING, 2005). A ausência de potencial osteogênico responde, em parte, pela baixa capacidade de consolidação e revitalização de enxertos alogênicos, que resulta nos altos índices de complicações. Estratégias utilizando tratamentos sistêmicos, particularmente com PTH₁₋₃₄, podem reduzir as limitações biológicas dos enxertos desvitalizados. Os bons resultados do uso clínico *off-label* de PTH₁₋₃₄ em pacientes com pseudartrose estimulou seu emprego com a finalidade de acelerar a consolidação de fraturas (PUZAS *et al.*, 2006; ASPENBERG *et al.*, 2010)

Em modelo murino de defeito segmentar femoral, REYNOLDS e colaboradores

(2011) demonstraram que o tratamento durante quatro semanas com 40 µg/kg/dia PTH₁₋₃₄ iniciado imediatamente após a reconstrução de defeito femoral com enxerto alogênico, resultou na formação de maior calo ósseo e alto percentual de consolidação e integração do enxerto na sexta semana de pós-operatório. Em um estudo subsequente, o mesmo grupo de autores (TAKAHATA *et al.*, 2012) avaliou, no mesmo modelo experimental, se doses 10 e 100 vezes menores (0,4 e 4 µg/kg/dia, respectivamente) teriam a mesma eficácia de doses mais altas (40 µg/kg/dia). Os resultados mostraram que apenas na dose de 40 µg/kg/dia, após nove semanas de tratamento, foi observada melhor resposta sobre a osteointegração e sobre a biomecânica do calo. Exceto pela maior resistência do calo ósseo, o tratamento com 40 µg/kg/dia PTH₁₋₃₄ por cinco semanas, iniciado uma semana após a cirurgia, resultou numa resposta osteogênica semelhante ao tratamento por nove semanas.

Embora não tenha sido objetivo do presente estudo definir a janela terapêutica ideal e nem a melhor dose-resposta ao tratamento com PTH₁₋₃₄, nossos resultados demonstraram que a administração diária de 30 µg/kg durante duas semanas, iniciado no dia seguinte à cirurgia, resultou em alto percentual de revitalização dos enxertos e melhor “qualidade biológica” dos sítios de consolidação das corticais nas interfaces do enxerto com o osso hospedeiro. A maior neoformação óssea no canal medular e nas interfaces do enxerto é um fator importante considerando a restauração óssea em estrutura e força mecânica.

Em relação ao percentual de consolidação, nossos resultados não podem ser comparados com o de outros autores, devido a diferenças biomecânicas entre a fixação estável com placa que utilizamos e a fixação com haste intramedular utilizada

pela maior parte dos autores (KABACK *et al.*, 2008; JACOBSON *et al.*, 2011; REYNOLDS *et al.*, 2011; TAKAHATA *et al.*, 2012). Na literatura não existem relatos sobre o papel do PTH₁₋₃₄ na reconstrução de defeitos ósseos críticos em murinos com enxertos estruturais fixados com placa e parafusos bloqueados.

Nossa opção por utilizar 30 e 40 µg/kg/dia PTH₁₋₃₄ foi baseada em relatos da literatura que apontavam para maior eficácia do tratamento adjuvante nessas doses na consolidação óssea (REYNOLDS *et al.*, 2011; TAKAHATA *et al.*, 2012). Em roedores não existe unanimidade quanto à dose de PTH₁₋₃₄ que mais se aproximaria da situação clínica. Em modelos murinos, o PTH₁₋₃₄ é utilizado em uma ampla faixa de variação (2,5 a 200 µg/kg/dia), que corresponde a uma dose 10 a 1000 vezes maior do que a dose recomendada para o tratamento de osteoporose em humanos (dose única de 20 µg/dia que corresponde em um indivíduo com 50-80 kg a 0,25-0,4 µg/kg/dia).

A ausência de resposta em murinos ao tratamento com doses baixas de PTH₁₋₃₄ foi demonstrada em estudos que tiveram como objetivo avaliar os efeitos dose-dependente do PTH₁₋₃₄ (NAKAZAWA *et al.*, 2005; KOMATSU *et al.*, 2009) e foram atribuídos a diferenças entre as espécies no metabolismo e no *clearance* hormonal (BARNES *et al.*, 2008). Outra característica desses estudos, que pode ter influenciado nos resultados, é o fato de que foram realizados com modelos de fraturas que podem consolidar espontaneamente independentemente do tratamento adjuvante com PTH₁₋₃₄ e da dose em que é administrado.

Outra questão que permanece indefinida é a escolha da melhor janela terapêutica do tratamento com PTH₁₋₃₄. Dependendo do momento em que o tratamento é iniciado, diferentes populações celulares que respondem ao fármaco são

ativadas, determinando em uma escala de prioridades a intensidade dos eventos relacionados com as diferentes etapas do processo de reparo ósseo.

Alguns genes relacionados diretamente com a formação óssea como *Osterix* e *Runx2*, ativados durante a exposição das BMSC ao PTH₁₋₃₄ estão diretamente relacionados com a consolidação de fraturas em modelos animais (KABACK *et al.*, 2008). Em condições experimentais *in vitro*, PTH₁₋₃₄ atua sobre a diferenciação das BMSC potencializando a diferenciação em osteoblastos (KABACK *et al.*, 2008, YANG *et al.*, 2009) sem interferir no potencial proliferativo (YANG *et al.*, 2009). Recentemente YANG e colaboradores (2016) demonstraram que PTH₁₋₃₄ utilizado de forma intermitente *in vitro* aumenta o potencial proliferativo e a diferenciação osteogênica de BMSC isoladas de ratos.

Nossos resultados mostraram que o tratamento *in vivo* com PTH₁₋₃₄ por duas semanas não influenciou na capacidade proliferativa *in vitro* de BMSC, já que o potencial clonogênico foi semelhante entre os grupos experimentais e o grupo controle tratado apenas com injeções diárias de salina. Através da análise de CFE, que fornece uma estimativa da frequência de células estromais da medula óssea humana (KUSNETSOV *et al.*, 2009), verificamos uma tendência do tratamento com 30 µg/kg/dia PTH₁₋₃₄ em aumentar essa frequência em relação ao tratamento com 40 µg/kg/dia PTH₁₋₃₄ e solução salina. Contudo, ainda não podemos justificar o melhor desempenho da dose de 30 µg/kg com esses resultados.

Uma possibilidade é que o PTH₁₋₃₄ nessa dose seja capaz de estimular a expressão de genes osteogênicos de forma mais precoce do que na dose de 40 µg/kg. KABACK e colaboradores (2008) mostraram que BMSC derivadas de camundongos

tratados com PTH₁₋₃₄ na dose 40 µg/kg por sete dias apresentam maior expressão dos genes *Osterix*, *Runx2*, *COL1A1*, *Osteocalcin* e *ALP* quando diferenciadas *in vitro* em relação às células derivadas de animais tratados com solução salina.

Esse estudo teve como pontos fortes a utilização de um modelo altamente reproduzível de defeito segmentar crítico reconstruído com enxertos estruturais alogênicos, estabilizados com placa e parafusos bloqueados. Identificamos como principais limitações à falta de comprovação da qualidade da consolidação por testes biomecânicos e a avaliação da ação do PTH₁₋₃₄ sobre a incorporação dos enxertos em um único ponto de observação. Para ambas as situações o principal fator limitante foi o custo elevado dos implantes para inclusão de mais animais que permitisse ampliar as ferramentas de análise e habilidade técnica para realizar o procedimento cirúrgico. Em resumo, o conjunto dos resultados do presente estudo mostrou que PTH₁₋₃₄ administrado por via subcutânea durante duas semanas potencializa o reparo e a integração de aloenxertos com o osso hospedeiro em um modelo murino de reconstrução de defeito femoral crítico. Esses resultados podem vir a alicerçar estudos em animais de grande porte visando o futuro uso clínico do PTH₁₋₃₄ com essa indicação.

6 CONCLUSÕES

1. O modelo experimental utilizado neste estudo é uma ferramenta extremamente útil para avaliar o papel de tratamentos sistêmicos sobre a consolidação e a incorporação de aloenxertos;
2. A estabilização com placa e parafusos de defeito ósseo segmentar crítico do fêmur de camundongos resulta em fixação estável e reprodutível;
3. Devido ao tipo de síntese utilizado que acarretou em baixa mobilidade da interface do enxerto com o osso hospedeiro, a consolidação do enxerto ocorreu de forma independente do tratamento adjuvante com PTH₁₋₃₄;
4. A qualidade biológica da consolidação óssea avaliada nas interfaces do enxerto com o osso hospedeiro em resposta ao tratamento com PTH₁₋₃₄, foi melhor no grupo de animais tratados com a dose de 30 µg/kg;
5. A administração diária de 30 µg/kg de PTH₁₋₃₄ durante duas semanas resulta na revitalização precoce de enxertos ósseos alogênicos em um modelo de reconstrução femoral em camundongos;
6. O tratamento *in vivo* com PTH₁₋₃₄ por um curto período de tempo não altera a frequência e nem o potencial clonogênico de progenitores mesenquimais.

7 Referências Bibliográficas

ALKHIARY YM, GERSTENFELD LC, KRALL E, WESTMORE M, SATO M, MITLAK BH, EINHORN TA. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *J Bone Joint Surg Am* 87:731-741, 2005.

ANDREASSEN TT, EJERSTED C, OXLUND H. *Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures.* *J Bone Miner Res* 14(6):960-968, 1999.

ARONSON J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 301: 124-31, 1994.

ASPENBERG P, GENANT HK, JOHANSSON T, NINO AJ, SEE K, KROHN K, GARCÍA-HERNÁNDEZ PA, RECKNOR CP, EINHORN TA, KALSKY GP, MITLAK BH, FIERLINGER A, LAKSHMANAN MC. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *J Bone Miner Res* 25(2):404-414, 2010.

ASPENBERG P, JOHANSSON T. Teriparatide improves early callus formation in distal radial fractures. *Acta Orthop* 81(2):234-236, 2010.

AUER JA, GOODSHIP A, ARNOCZKY S, PEARCE S, PRICE J, CLAES L, VON RECHENBERG, B., HOFMANN-AMTENBRINCK, M., SCHNEIDER, E., MULLER-TERPITZ, R., THIELE, F., RIPPE, K.P., AND GRAINGER, D.W. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8, 72, 2007.

BARNES GL, KAKAR S, VORA S, MORGAN EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Stimulation of fracture- healing with systemic intermittent parathyroid hormone treatment. *J Bone Joint Surg Am* 90 1S:120-127, 2008.

BELLIDO T, ALI AA, PLOTKIN LI, FU Q, GUBRIJ I, ROBERSON PK, WEINSTEIN RS, O'BRIEN CA, MANOLAGAS SC, JILKA RL. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem* 278:50259-50272, 2003.

BESSA PC, CASAL M, REIS RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* 2(1):1-13, 2008.

BHANDARI M, JIN L, SEE K, BURGE R, GILCHRIST N, WITVROUW R, KROHN KD, WARNER MR, AHMAD QI, MITLAK B. Does teriparatide improve femoral nec fracture healing: results from a randomized placebo-controlled trial. *Clin Orthop Relat Res* 474(5):1234-1244, 2016.

BRIGMAN BE, HORNICEK FJ, GEBHARDT MC, MANKIN HJ. Allografts about the knee in young patients with high-grade sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 421:232-239, 2004.

BROWN EM, GAMBA G, RICCARDI D, LOMBARDI M, BUTTERS R, KIFOR O, SUN A, HEDIGER MA, LYTTON J, HEBERT SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366(6455):575-580,1993.

BUKATA SV, PUZAS JE. Orthopedic uses of teriparatide. *Curr Osteoporos Rep* 8(1):28-33, 2010.

CANALIS E, GIUSTINA A, BILEZIKIAN JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 357:905-916, 2007.

CANALIS E. Insulin-like growth factors and the local regulation of bone formation. *Bone*. 14: 273-6, 1993.

CHAMBERS TJ, FULLER K, MCSHEEHY PM, PRINGLE JA. The effects of calcium regulating hormones on bone resorption by isolated human osteoclastoma cells. *J Pathol* 145:297-305, 1985.

CHEN B, LIN TM YANG X, LI Y, XIE D, CUI H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) application regulates cAMP-response element binding protein activity to promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells, via the cAMP/PKA signaling pathway. *Exp Ther Med* 11(6):2399-2406, 2016.

CHEN HL, DEMIRALP B, SCHNEIDER A, KOH AJ, SILVE C, WANG CY, McCAULEY LK. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *J Biol Chem* 277:19374-19381, 2002.

CHINTAMANENI S, FINZEL K, GRUBER BL. Successful treatment of sternal fracture nonunion with teriparatide. *Osteoporos Int* 21(6):1059-1063, 2010.

CHOI, P., OGILVIE, C., THOMPSON, Z., MICLAU, T., AND HELMS, J.A. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res* 22, 1100, 2004.

COOK SD, BAFFES GC, WOLFE MW. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 76: 827-8, 1994.

COURT-BROWN CM, BUGLER KE, CLEMENT ND, DUCKWORTH AD, MCQUEEN MM. The epidemiology of open fractures in adults. A 15-year review. *Injury* 43:891-7, 2012.

DATTA NS, ABOU-SAMRA AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 21:1245-1254, 2009.

DAUGAARD H, ELMENGAARD B, ANDREASSEN TT, BECHTOLD JE, LAMBERG A, SOBALLE K. Parathyroid hormone treatment increases fixation of orthopedic implants with gap healing: a biomechanical and histomorphometric canine study of porous coated titanium alloy implants in cancellous bone. *Calcif Tissue Int* 88:294-303, 2011

DAUGAARD H, ELMENGAARD B, ANDREASSEN TT, LAMBERG A, BECHTOLD JE, SOBALLE K. Systemic intermittent parathyroid hormone treatment improves osseointegration of press-fit inserted implants in cancellous bone. A canine study. *Acta Orthop* 83(4):411-419, 2012.

DHILLON RS, SCHWARZ EM. Teriparatide therapy as an adjuvant for tissue engineering and integration of biomaterials. *J Mater Res* 4(6): 1117-1131, 2011.

DOBNIG H, TURNER RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 138:4607-4612, 1997.

EINHORN TA, MAJESKA RJ, MOHAIDEEN A, KAGEL EM, BOUXSEIN ML, TUREK TJ, WOZNEY JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 85(8):1425-1435, 2003

EINHORN TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am* 85 (Suppl 3):82-88, 2003.

FAHLGREN A, YANG X, CIANI C, RYAN JA, KELLY N, KO FC, VAN DER MEULEN MCH, BOSTROM PGM. The effects of PTH, loading and surgical insult on cancellous bone at the bone-implant interface in the rabbit. *Bone* 52(2):718-724, 2013.

GARCIA, P., HERWERTH, S., MATTHYS, R., HOLSTEIN, J.H., HISTING, T., MENDER, M.D., AND POHLEMAN, T. The Locking Mouse Nail: a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res* 169, 220, 2011.

GARRIDO, C.A., LOBO, S.E., TURIBIO, F.M., AND LEGEROS, R.Z. Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: clinical outcomes. *Int J Biomater* 2011, 1, 2011.

GOLTZMAN D, HENDY GN. The calcium-sensing receptor in bone. Mechanistic and therapeutic insights. *Nature Rev Endocrinol* 11:298-307, 2015.

HANLEY DA, WATSON PH, HODSMAN AB, DEMPSTER DW. Pharmacological Mechanisms of Therapeutics: Parathyroid Hormone. In: Bilezikian, J.; Raisz, LG.; Martin, TJ., editors. *Principles of Bone Biology*. Amsterdam: Elsevier: 1661-1695, 2008.

HISTING T, GARCIA P, HOLSTEIN JH, KLEIN M, MATTHYS R, NUETZI R, SLECK R, LASCHKE MW, WEHNER T, BINDI R, RECKNAGEL S, STUERMER EK, VOLLMAR B, WILDEMANN B, LIENAU J, WILLIE B, PETERS A, IGNATIUS A, POHLMANN T, CLAES L AND MENDER MD. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49(4): 591-9, 2011.

HOLZER G, MAJESKA RJ, LUNDY MW, HARTKE JR, EINHORN TA. Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 366:258-263, 1999.

ILIZAROV GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 250: 8-26, 1990.

ISHIZUYA T, YOKOSE S, HORI M, NODA T, SUDA T, YOSHIKI S, YAMAGUCHI A. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 99:2961-2970, 1997.

JACOBSON JA, YANOSO-SCHOLL L, REYNOLDS DG, DADALI T, BRADICA G, BUKATA S, PUZAS E, ZUSCIK M, ROSIER R, O'KEEFE R, SCHWARZ EM, AWAD HA. Teriparatide therapy and beta-tricalcium phosphate enhance scaffold reconstruction of mouse femoral defects. *Tissue Eng (A)* 17(3-4):389-397, 2011.

JILKA RL, WEINSTEIN RS, BELLIDO T, ROBERSON P, PARFITT AM, MANOLAGAS SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104: 439-446, 1999.

JILKA RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40:1434-1446, 2007.

KABACK LA, SOUNG DO Y, NAIK A, GENEAU G, SCHWARZ EM, ROSIER RN, O'KEEFE RJ, DRISSI H. *Teriparatide* (1-34 human PTH) regulation of osterix during fracture repair. *J Cell Biochem* 105(1):219-226, 2008.

KAKAR S, EINHORN TA, VORA S, MIARA LJ, HON G, WIGNER NA, TOBEN D, JACOBSEN KA, AL-SEBAEI MO, SONG M, TRACKMAN PC, MORGAN EF, GERSTENFELD LC, BARNES GL. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *J Bone Miner Res* 22(12):1903-1912, 2007.

KEATING JF, SIMPSON AHRW, ROBINSON CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg [Br]* 87:142-50, 2005.

KOMATSU DE, BRUNE KA, LIU H, SCHMIDT AL, HAN B, ZENG QQ, YANG X, NUNES JS, LU Y, GEISER AG, MA YL, WOLOS JA, WESTMORE MS, SATO M. Longitudinal in vivo analysis of the region- specific efficacy of parathyroid hormone in a rat cortical defect model. *Endocrinology* 150:1570-1579, 2009.

KOMATSUBARA S, MORI S, MASHIBA T, NONAKA K, SEKI A, AKIYAMA T, MIYAMOTO K, CAO Y, MANABE T, NORIMATSU H. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora. *Bone* 36(4):678-687, 2005.

KOUSTENI S; BILEZIKIAN J. Cellular Actions of Parathyroid Hormone. In: Bilezikian, J.; Raisz, LG.; Martin, TJ., editors. *Principles of Bone Biology*. Amsterdam: Elsevier: 639-56, 2008.

KRAENZLIN ME, MEIER C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis. *Nature Rev Endocrinol* 7(11):647-656, 2011.

KRISHNAN V, MOORE TL, MA YL, HELVERING LM, FROLIK CA, VALASEK KM, DUCY P, GEISER AG. Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol Endocrinol* 17:423-435, 2003.

KUSNETSOV SA, MANKANI MH, BIANCO P, ROBEY PG. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Res* 2(1):83-94, 2009.

LOCKLIN RM, KHOSLA S, TURNER RT, RIGGS BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 89:180-190, 2003.

LOU S, LV H, WANG G, ZHANG L, LI M, LI Z, ZHANG L AND TANG P. The effect of teriparatide on fracture healing of osteoporotic patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Biomed Res Int* 2016;2016:6040379. doi: 10.1155/2016/6040379. Epub 2016 Jun 26.

MACKENZIE EJ ,BOSSE MJ. Factors influencing outcome following limb-threatening lower limb trauma: Lessons learned from the Lower Extremity Assessment Project (LEAP). *J Am Acad Orthop Surg* 14(10):S205-S210, 2006

MAHENDRA A, MACLEAN AD. Available bio- logical treatments for complex non-unions. *Injury*38: S7-12, 2007.

MANASSERO M, VIATEAU V, MATTHYS R, DESCHEPPER M, VALLEFUOCO R, DVM, BENSIDHOUM M, PETITE H. A novel murine femoral segmental critical-sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineering purposes. *Tissue Eng Part C* 19(4):217-280, 2013.

MARSELL R, EINHORN TA. The biology of fracture healing. *Injury* 42:551-55, 2011.

MCSHEEHY PM, CHAMBERS TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118:824-828, 1986.

MICLAU T, SEN MK. *Injury* 38 Suppl 1, S75-S80, 2007

MORAN SL, SHIN AY, BISHOP AT. The use of massive bone allograft with intramedullary free fibular flap for limb salvage in a pediatric and adolescent population. *Plast Reconstr Surg*. 118: 413-9, 2006.

NAKAZAWA T, NAKAJIMA A, SHIOMI K, MORIYA H, EINHORN TA, YAMAZAKI M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone* 37:711-719, 2005.

NEER RM, ARNAUD CD, ZANCHETTA JR, PRINCE R, GAICH GA, REGINSTER JY, HODSMAN AB, ERIKSEN EF, ISH-SHALOM S, GENANT HK, WANG O, MITLAK BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344(19):1434-1441, 2001.

NISHIDA S, YAMAGUCHI A, TANIZAWA T, ENDO N, MASHIBA T, UCHIYAMA Y, SUDAT, YOSHIKI S, TAKAHASHI HE. Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *Bone* 15(6):717-723, 1994.

OBREMSKEY W, MOLINA C, COLLINGE C, TORNETA P, SAGI C, SCHMIDT A, PROBE R, AHN J, NANA A. Current practice in the management of open fractures among orthopaedic trauma surgeons. Part B: Management of segmental long bone defects. A survey of orthopaedic trauma association members. *J Orthop Trauma* 28(8):e203-e207, 2014.

OETGEN, M.E., MERRELL, G.A., TROIANO, N.W., HOROWITZ, M.C., AND KACENA, M.A. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 39, 1119, 2008.

O'LOUGHLIN PF, MORR S, BOGUNOVIC L, KIM AD, PARK B, LANE JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 90, Suppl 1:79-84, 2008.

ONYIA JE, HELVERING LM, GELBERT L, WEI T, HUANG S, CHEN P, DOW ER, MARAN A, ZHANG M, LOTINUN S, LIN X, HALLADAY DL, MILES RR, KULKARNI NH, AMBROSE EM, MA YL, FROLIK CA, SATO M, BRYANT HU, TURNER RT. Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem* 95:403-418, 2005.

OTEO-ALVARO A, MORENO E. Atrophic humeral shaft nonunion treated with teriparatide (rh PTH 1–34): a case report. *J Shoulder Elbow Surg* 19(7):e22-28, 2010.

PEICHL P, HOLZER LA, MAIER R, HOLZER G. Parathyroid Hormone 1–84 accelerates fracture healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *J Bone Joint Surg Am* 93(17):1583-1587, 2011.

PENG H, USAS A, OLSHANSKI A, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res*. 20: 2017-27, 2005.

PERRY CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop*. 360: 71-86, 1999.

PNEUMATICOS SG, TRIANTAFYLLOPOULOS GK, BASDRA EK, PAPAVALASSILIOU AG. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J. Cell. Mol. Med*. 14 (11): 2561-2569, 2010.

PUZAS JE, HOUCK J, BUKATA SV. Accelerated fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg* 14 (10): S145-151, 2006.

RESMINI G, IOLASCON G. 79-year-old post-menopausal woman with humerus fracture during teriparatide treatment. *Aging Clin Exp Res* 19(4 Suppl):30-31, 2007.

REYNOLDS DG, SHAIKH S, PAPUGA MO, LERNER AL, O'KEEFE RJ, SCHWARZ EM, AWAD HA. μ CT-based measurement of cortical bone graft-to-host union. *J Bone Miner Res* 24(5):899-907, 2009.

REYNOLDS DG, TAKAHATA M, LERNER AL, O'KEEFE RJ, SCHWARZ EM, AWAD HA. Teriparatide therapy enhances devitalized femoral allograft osseointegration and biomechanics in a murine model. *Bone* 48(3):562-570, 2011.

RICKARD DJ, WANG FL, RODRIGUEZ-ROJAS AM, WU Z, TRICE WJ, HOFFMAN SJ, VOTTA B, STROUP GB, KUMAR S, NUTTALL ME. Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39(6):1361-1372, 2006.

RUBERY PT, BUKATA SV. Teriparatide may accelerate healing in delayed unions of type III odontoid fractures: a report of 3 cases. *J Spinal Disord Tech* 23(2):151-152, 2010.

RÜEDI, T.P.; BUCKLEY R.E.; MORAN C.G. Princípios AO do tratamento de fraturas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

RYDER KM, TANNER SB, CARBONE L, WILLIAMS JE, TAYLOR HM, BUSH A, PINTEA V, WATSKY MA. Teriparatide is safe and effectively increases bone biomarkers in institutionalized individuals with osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 28(2):233-239, 2010.

SCHEUFLER O, SCHAEFER DJ, JAQUIERY C, et al. Spatial and temporal patterns of bone formation in ectopically pre-fabricated, autologous cell-based engineered bone flaps in rabbits. *J Cell Mol Med*. 12: 1238-49, 2008.

SCHMITZ JP, HOLLINGER JO. The critical size defect as an experimental model for cranio-mandibular non unions. *Clin Orthop* 205: 299-308, 1986.

SCHWEIBERER, L., BAUMGART, R., AND DEILER, S. [The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance]. *Chirurg* 70, 1193, 1999.

SENKOYLU A, UZUNOK D, PISKIN E. Treatment of segmental bone defects in rats by the stimulation of bone marrow osteo-progenitor cells with prostaglandin E2. *Int Orthop*. 29: 73-7, 2005.

SILVA BC, COSTA AG, CUSANO NE, KOUSTENI S, BILEZIKIAN JP. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest* 34(10):801-810, 2011.

SWIONTKOWSKI MF, ARO HT, DONELL S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A sub- group analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am*. 88: 1258-65, 2006.

TAKAHATA M, SCHWARZ EM, CHEN T, O'KEEFE RJ, AWAD HA. Delayed short course treatment with teriparatide (PTH₁₋₃₄) improves femoral allograft healing by enhancing intramembranous bone formation at the graft-host junction. *J Bone Miner Res* 27(1):26-37, 2012.

TIYAPATANAPUTI P, RUBERY PT, CARMOUCHE J, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, ZHANG X. A novel murine segmental femoral graft model. *J Orthop Res* 22(6):1254-1260, 2004.

TZIOUPIS C, GIANNOUDIS PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* 38(Suppl 2):S3-9, 2007.

WANG YH, LIU Y, ROWE DW. Effects of transient PTH on early proliferation, apoptosis, and subsequent differentiation of osteoblast in primary osteoblast cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E594-603, 2007.

WEINREB M, GROSSKOPF A, SHIR N. The anabolic effect of PGE2 in rat bone marrow cultures is mediated via the EP4 receptor subtype. *Am J Physiol*. 276: E376-83, 1999.

WHEELER DL, ENNEKING WF. Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clin Orthop Relat Res* 435: 36-42, 2005

WU D, RAZZANO P, GRANDE DA. Gene therapy and tissue engineering in repair of the musculoskeletal system. *J Cell Biochem*. 88: 467-81, 2003.

YANG C, FREI H, BURT HM AND ROSSI F: Effects of continuous and pulsatile PTH treatments on rat bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 791-796, 2009.

YANG C, FREI H, BURT HM, ROSSI F. Effects of continuous and pulsatile PTH treatments on rat bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Comm* 380(4):791-796, 2009.

ZATI A, SARTI D, MALAGUTI MC, PRATELLI L. Teriparatide in the treatment of a loose hip prosthesis. *J Rheumatol* 38(4):778-780, 2011