

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

EFEITO DA TERIPARATIDA NA FUSÃO ÓSSEA PÓS ARTRODESE DE COLUNA
VERTEBRAL EM BIOMODELO DE OSTEOPOROSE

Gustavo Cesar de Almeida Peçanha

Rio de Janeiro
Fevereiro
2019

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

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

EFEITO DA TERIPARATIDA NA FUSÃO ÓSSEA PÓS ARTRODESE DE COLUNA
VERTEBRAL EM BIOMODELO DE OSTEOPOROSE

Gustavo Cesar de Almeida Peçanha

Dissertação de Mestrado 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

Orientador (es): Prof. Dr^a. Ana Carolina Leal de Oliveira
Prof^a. Dr^a. Amanda Cavalcanti

Rio de Janeiro
Fevereiro
2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

P358e Peçanha, Gustavo Cesar de Almeida.
Efeito da teriparatida na fusão óssea pós artrodese de coluna vertebral
em biomodelo de osteoporose / Gustavo Cesar de Almeida Peçanha. —
2019.
83f.

Orientadores: Ana Carolina Leal de Oliveira e Amanda Cavalcanti.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2019.

1. Osteoporose. 2. Teriparatida. 3. Fusão Vertebral. 4. Ortopedia. I.
Oliveira, Ana Carolina Leal de; Cavalcanti, Amanda, orient. II. Título.

NLM WE 304

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

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

EFEITO DA TERIPARATIDA NA FUSÃO ÓSSEA PÓS ARTRODESE DE COLUNA
VERTEBRAL EM BIOMODELO DE OSTEOPOROSE

Gustavo Cesar de Almeida Peçanha

Banca examinadora:

Dr. Anneliese Fortuna de A. F. da Costa (Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad)

Dr. Liszt Palmeiras de Oliveira (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

Dr. Rafaela Sartore da Costa (Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil
Haddad)

Dr. Veronica Aran Ponte (Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad)

Rio de Janeiro
Fevereiro
2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir realizar tantos sonhos, por Seu infinito amor e Sua voz envolvente que não me permitiu desistir, entusiasmando-me a olhar para novos objetivos.

Essa dissertação de mestrado nunca seria possível sem o precioso apoio de várias pessoas.

Agradeço, especialmente, à minha orientadora, Doutora Ana Carolina Leal de Oliveira, por toda paciência e grande empenho com que sempre me orientou em todas etapas desse trabalho. Muito obrigado, por me ter apontado com muita competência melhores caminhos, motivando-me sempre a superar os desafios.

Desejo igualmente agradecer à minha equipe de trabalho, Dra. Amanda Cavalcanti e ao colega e amigo Cleiton Dias Naves. Vivemos momentos muito agradáveis, sempre buscando a perfeição no cuidado com os inesquecíveis murinos envolvidos no estudo.

Agradeço também à Dra. Maria Eugenia Leite Duarte e ao Dr. João Antônio Matheus Guimarães que acreditaram e apoiaram nosso biomodelo.

Agradeço também aos Doutores Rafael Senos e Kurt Hankenson – Michigan University- colaboradores do estudo, e aos doutores Anneliese Fortuna, Danielle Bonfim, Diego Aguiar, Rafaela Sartore e Rhayra Braga que também participaram e apoiaram esse trabalho.

Por último, quero agradecer à minha esposa Alessandra Peçanha e filho Gustavo Filho, amigos, e especialmente à minha mãe, Professora Shirley Peçanha, pelo apoio incondicional que sempre me dedicaram e por motivarem a elaboração deste trabalho.

*O conhecimento é o processo de acumular dados;
a sabedoria reside na sua simplificação*

Martin H. Fischer

RESUMO

PEÇANHA, Gustavo Cesar de Almeida. Efeito da teriparatida na fusão óssea pós artrodese de coluna vertebral em biomodelo de osteoporose, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2019

Nos últimos 20 anos, houve um aumento no número de pacientes com osteoporose submetidos a cirurgias de coluna. O tratamento com teriparatida, um medicamento com ação osteoanabólica, pode reduzir as taxas de falha desses procedimentos, entretanto, não há consenso quanto ao tempo de uso dessa terapia, nem quanto ao melhor momento para que ela seja iniciada. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito modulador da terapia com teriparatida nas etapas iniciais e tardias do processo de formação da massa de fusão, visando identificar o melhor momento para início deste tratamento em pacientes osteoporóticos submetidos a cirurgia de fusão vertebral. Para isso, realizamos um estudo com 27 ratas osteoporóticas submetidas à cirurgia de artrodese lombar. Os animais foram alocados em 4 grupos experimentais: grupo PTH 1-15, tratados com doses diárias de 30µg/kg de teriparatida do dia 1 ao dia 15 pós cirurgia; PTH 16-30, que recebeu teriparatida do dia 16 ao dia 30 pós cirurgia; grupo PTH 30, tratados com teriparatida por 30 dias após a cirurgia de fusão; e o grupo controle, não tratado. A eutanásia ocorreu cinco semanas após a cirurgia de fusão vertebral. O grupo controle apresentou 80% de fusão, o grupo PTH 1-15, 62,5%; o grupo PTH 16-30, 100% e o grupo PTH 30, 75% de taxa de fusão, avaliada por palpação manual da peça anatômica e análise radiográfica. A avaliação por microtomografia revelou que a massa de fusão dos animais dos grupos PTH 16-30 e PTH30 apresentavam aspecto mais compactado, indicando remodelamento e amadurecimento da mesma. A massa de fusão dos animais do grupo PTH 1-15 apresentou características microestruturais semelhantes á do grupo controle. A conclusão deste estudo demonstra que a terapia de curto prazo com teriparatida nas fases iniciais é dispensável e melhores resultados são alcançados quando iniciado nas fases mais tardias do processo de formação da artrodese em biomodelo de osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose, Teriparatida, Fusão Vertebral

ABSTRACT

PEÇANHA, Gustavo Cesar de Almeida. Effect of teriparatide in bone fusion after arthrodesis of vertebral column in osteoporosis biomodelo. Rio de Janeiro, 2019. Master Thesis - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2019.

Over the past 20 years, there has been an increase in the number of osteoporotic patients undergoing spinal surgery. Treatment with teriparatide (PTH), an osteoanabolic drug, may reduce the failure rates of these procedures; however, there is no consensus regarding the length of treatment nor as to the best time to initiate it. The aim of this study is to evaluate the modulating effect of teriparatide in the initial and late stages of the fusion process, in order to identify the best time to start this treatment in osteoporotic patients submitted to vertebral fusion surgery. To address this issue, we performed a study with 27 osteoporotic rats submitted to lumbar arthrodesis surgery. The animals were allocated in 4 experimental groups: group PTH 1-15, treated with daily doses of 30µg / kg of teriparatide from day 1 to day 15 post surgery; PTH 16-30, who received teriparatide from day 16 to day 30 post surgery; PTH 30 group, treated with teriparatide for 30 days post fusion surgery; and the untreated control group. Euthanasia was performed 5 weeks after spinal fusion surgery. The control group had 80% of fusion, the group PTH 1-15, 62.5%; the PTH 16-30 group, 100% and the PTH 30 group, 75% of fusion rate, evaluated by manual palpation of the lumbar segment and radiographic analysis. The microtomography evaluation revealed that the bone mass fusion of the animals of the PTH-16-30 and PTH 30 groups showed a higher degree of compaction, indicating its remodeling and maturation. The bone mass of animals of PTH 1-15 group presented microstructural characteristics similar to that of the control group. The conclusion of this study demonstrates that short-term therapy with teriparatide in the early stages of bone mass fusion is dispensable and better results are achieved when started at later stages of the arthrodesis consolidation process.

Keywords: Osteoporosis, Teriparatide, Spine Fusion

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Cirurgia de artrodese da coluna vertebral.....	10
1.1.1 Aspectos biológicos da fusão segmentar	12
1.2 Osteoporose.....	15
1.2.1 Etiologia da osteoporose.	17
1.2.2 Fisiopatologia da osteoporose.....	17
1.2.3 Osteoporose e cirurgias de fusão vertebral	20
1.3 Teriparatida	23
1.3.1 Uso nas cirurgias de fusão	25
1.4 Modelos animais em ortopedia	27
1.4.1 Modelo de osteoporose induzida por ooforectomia	27
1.4.2 Modelos de fusão posterolateral.....	28
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 Desenho experimental	33
4.2 Manutenção dos animais	33
4.3 Cirurgia de ooforectomia	34
4.4 Cirurgia de fusão posterolateral da coluna vertebral	35
4.5 Coleta de amostras.....	36
4.5.1 Coleta de sangue e obtenção de plasma	36
4.5.2 Coleta da amostra tecidual.....	36
4.6 Quantificação de CTX-I no plasma.....	37

4.7	Avaliação manual da fusão.....	37
4.8	Análise radiográfica	38
4.9	Análise por microtomografia computadorizada (μ CT).	38
4.10	Análise dos dados	39
5.	RESULTADOS.....	40
5.1	Caracterização da osteoporose.....	40
5.2	Avaliação da fusão Vertebral.....	41
5.3	Avaliação da microarquitetura da massa de fusão	44
6.	DISCUSSÃO	47
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO A. LICENÇA DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS (CEUA/INTO)		64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BV/TV	fração de volume ósseo
BS/BV	superfície óssea específica
μCT	microtomografia computadorizada
μg	micrograma
ACV	artrodese da coluna vertebral
BMP	proteína morfogênica do osso, do inglês <i>bone morphogenetic protein</i>
BRU	unidade de remodelamento ósseo, do inglês <i>bone remodeling unit</i>
cm	centímetro
CTX-I	telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I
DMO	densidade mineral óssea
DP	desvio padrão
DXA	absortometria de raios-x em duas energias, do inglês <i>dual energy x-ray absorptiometry</i>
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma
mg	miligrama
mL	mililitro
Ng	nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	osteoprotegerina
PFA	paraformaldeído
PTH	Teriparatida
RANKL	ligante do receptor ativador do fator nuclear Kb
RPM	rotação por minuto
Sapos	<i>São Paulo Osteoporosis Study</i>
SUS	Sistema único de Saúde
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Sp	espaçamento entre trabéculas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características gerais de uma vértebra.	10
Figura 2 : Procedimento cirúrgico de artrodese da coluna vertebral..	12
Figura 3 : Processos de ossificação na artrodese vertebral.	14
Figura 4: Remodelamento ósseo.....	19
Figura 5 : Desenho experimental do estudo.	34
Figura 6: Preparo do enxerto ósseo autólogo obtido a partir de vértebras caudais.	35
Figura 7: Avaliação da indução de osteoporose.	40
Figura 8: Avaliação manual da fusão.	41
Figura 9: Avaliação radiográfica da fusão.....	42
Figura 10 : Aspectos radiológicos da massa de fusão.	43
Figura 11: Avaliação dos aspectos qualitativos da massa de fusão.....	45
Figura 12: Avaliação tridimensional da massa de fusão por microtomografia.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cirurgia de artrodese da coluna vertebral

A coluna vertebral, também chamada de espinha dorsal, compõe-se de ossos, chamados vértebras, e um grande número de articulações, as quais estão sobrepostas em forma de uma coluna, daí o termo coluna vertebral. Sua principal função é proteger a medula espinhal e fornecer um eixo de sustentação corporal, permitindo a realização de movimentos.

Uma vértebra típica é constituída por duas partes essenciais: uma massa cilíndrica com padrão de osso trabecular (ou esponjoso), chamada de corpo vertebral e o arco vertebral posterior formado por lâmina, pedículos e processos laterais e posteriores com padrão mais cortical (NETTER, 2015) (**Figura 1**).

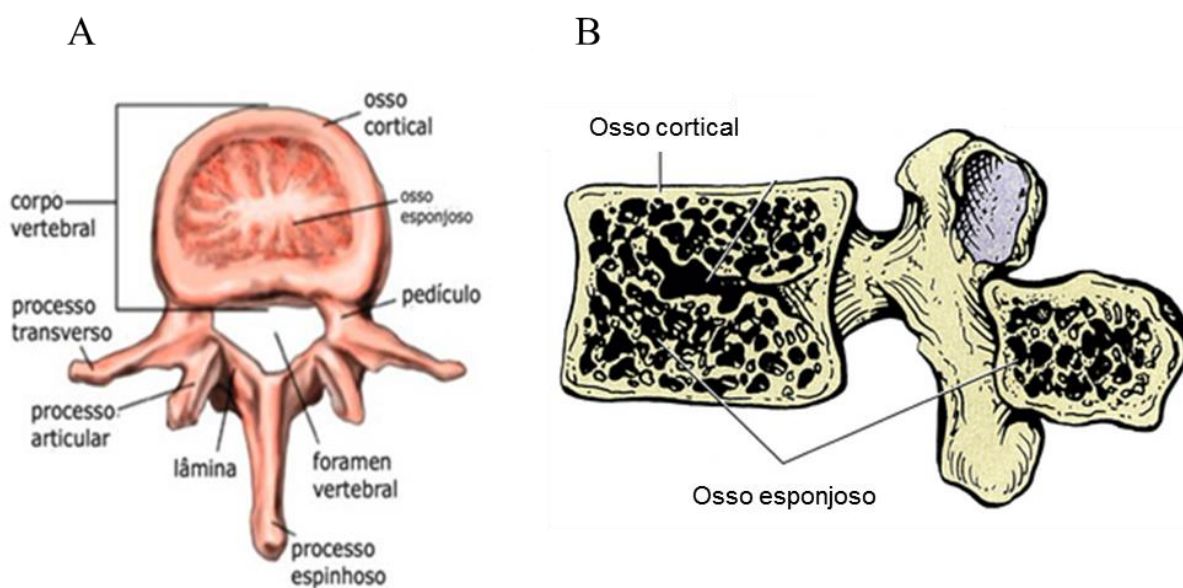


Figura 1: Características gerais de uma vértebra. Representação de uma vértebra lombar, demonstrando: (A) relação do corpo vertebral e elementos posteriores; lâmina, processo espinhoso, processo articular, pedículo e processo transverso e (B) distribuição de osso cortical e esponjoso nas diferentes regiões da vértebra. Adaptado de Netter, 2015.

Diversos fatores como doenças degenerativas, fraturas ou deformidades, podem alterar a estrutura da coluna vertebral, danificando as vértebras ou os tecidos adjacentes. Estas alterações estão, frequentemente, associadas à dor intensa, limitação do movimento, sintomas neurológicos e redução da qualidade de vida (CLOYD et al., 2008).

Nesse sentido, os procedimentos de artrodese da coluna vertebral (ACV), ou fusão vertebral, são considerados o padrão ouro para o tratamento de doenças degenerativas, tumorais, traumáticas, infecciosas e deformidades, sendo muito utilizados na existência de instabilidade segmentar patológica ou pós-descompressão neurológica (BODEN, 2000, MARTIN et al., 2007). A realização deste tipo de procedimento vem aumentando significativamente nos últimos anos. Deyo e colaboradores (2005) observaram um aumento de cerca de 220% na realização de cirurgias de artrodese vertebral entre os anos de 1990 e 2001 (DEYO et al., 2005; MARTIN et al., 2007).

O procedimento de artrodese vertebral consiste em induzir a fusão de duas ou mais vértebras, de modo a impedir a movimentação entre elas. Biologicamente, a fusão segmentar é definida como a formação de uma ponte óssea entre vértebras adjacentes (**Figura 2**). Isso é possível, cirurgicamente, através da criação de um leito ósseo e utilização de enxerto. Este processo desencadeia diversos eventos biológicos, como reabsorção e neoformação óssea, que permitem a integração deste enxerto e formação de uma ponte óssea unindo os dois ossos adjacentes (BODEN, 1998; MORONE et al., 1998; BLUMSOHN et al., 2011).

A cirurgia de fusão posterolateral se inicia com a dissecação subperiosteal dos segmentos escolhidos. Segue-se a remoção da camada superficial do osso cortical (decorticação) dos processos transversos das vértebras a serem fundidas. Posteriormente, aplica-se o enxerto ósseo unindo esses processos transversos bilateralmente (CAMPBELL et al., 2015).

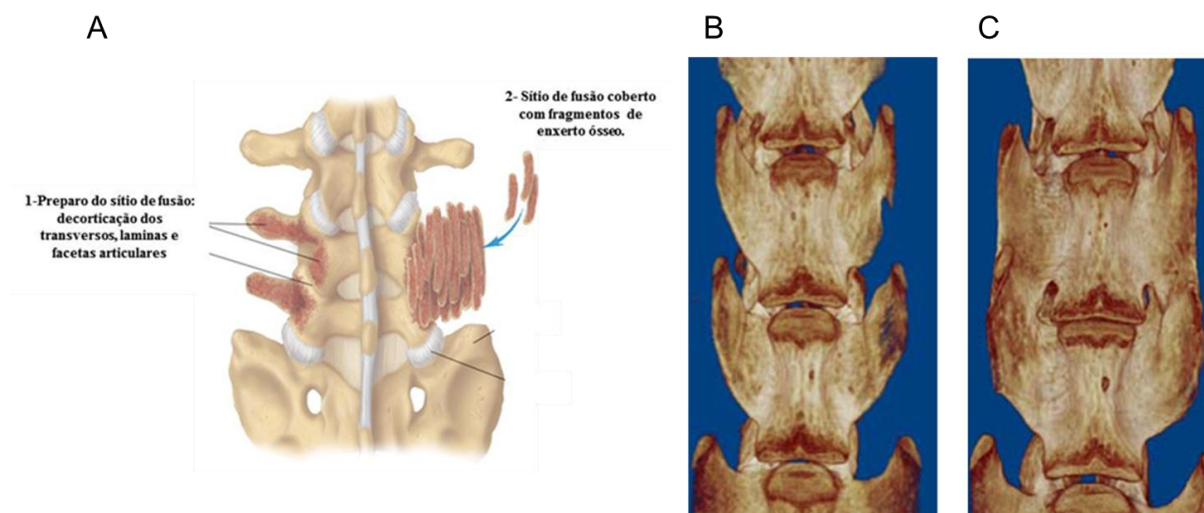


Figura 2 : Procedimento cirúrgico de artrodeose da coluna vertebral. (A) Figura esquemática demonstrando as etapas de decorticação, seguido da colocação do enxerto ósseo entre os processos transversos das vértebras. Reconstruções da coluna de ratos sem (B) e com (C) artrodeose vertebral, respectivamente. Adaptado de Reid et al., 2011.

1.1.1 Aspectos biológicos da fusão segmentar

O processo de artrodeose posterolateral da coluna é diferente do processo de consolidação óssea de fraturas, ainda que apresentem semelhanças em diversos aspectos (BODEN, 1998; BODEN et al., 2002; MORONE et al., 1998). O processo biológico de formação da artrodeose vertebral requer a integração do enxerto, envolvendo os processos de reabsorção deste enxerto, neoformação e remodelamento ósseo. A avaliação deste processo em um contexto clínico é dificultada pela falta de metodologias adequadas (BRODSKY et al., 1991). Dessa forma, os complexos eventos biológicos envolvidos na fusão óssea vertebral são mais bem estudados em modelos animais. Boden e colaboradores (2002), usando um modelo de coelhos, dividiram o processo de fusão em cinco fases (BODEN et al., 2002).

1 - Inflamação: Logo após a cirurgia, há a formação de um hematoma rico em células inflamatórias e contendo restos celulares resultantes do trauma cirúrgico. Este ambiente inflamatório, rico em citocinas e fatores de crescimento, permite a migração de fibroblastos que sequencialmente formam um estroma fibrovascular que desempenha importante papel na organização e nutrição do enxerto. A importância desta etapa para o processo de integração

do enxerto é evidenciada por estudos que mostram que o uso de medicamentos anti-inflamatórios no período pré-operatório está associado à redução das taxas de fusão (RIEW et al., 2003; THALLER et al., 2005).

2 - Vascularização: A formação vascular tem início, sendo caracterizada pelo surgimento de brotos vasculares. Observa-se também a predominância de ossificação intramembranosa próximo aos processos transversos decorticados, com poucas áreas de formação cartilaginosa e ossificação endocondral. Na região central do enxerto, nota-se pequena quantidade de cartilagem.

3 - Osteoindução: Esta fase é caracterizada pela intensa diferenciação de osteoblastos. Observa-se também o aumento do número de condroblastos, da vascularização e intensa reabsorção das áreas necróticas do enxerto (porção central). A neoformação óssea, iniciada próximo aos processos transversos, caminha para a porção central do enxerto.

4 – Osteocondução: Predomina o processo de ossificação endocondral na porção mais central, unindo a porção superior à porção inferior da massa de fusão. Simultaneamente, tem-se a ação dos osteoclastos e osteoblastos, reabsorvendo e formando osso, respectivamente.

5 - Remodelação: A massa de fusão amadurece através do remodelamento ósseo, apresentando aspecto mais compactado. A formação do padrão cortical da periferia e trabecular, na porção central do osso, se completam.

Dois processos de ossificação participam da constituição da fusão posterolateral: endocondral e intramembranoso. A ossificação endocondral é o processo que forma os ossos longos, onde a formação óssea é precedida pela formação de um molde cartilaginoso. Já no processo intramembranoso, o osso é formado diretamente por osteoblastos sem haver a formação do molde de cartilagem. Estudos que avaliaram o crescimento ósseo em artrodese posterolateral da coluna demonstraram que no processo de fusão vertebral, há a predominância de ossificação intramembranosa próximo aos processos transversos enquanto a

ossificação endocondral ocorre na porção mais central da ponte óssea que está em formação (CONTI et al., 2006; PARK et al., 2017) (*Figura 3*).

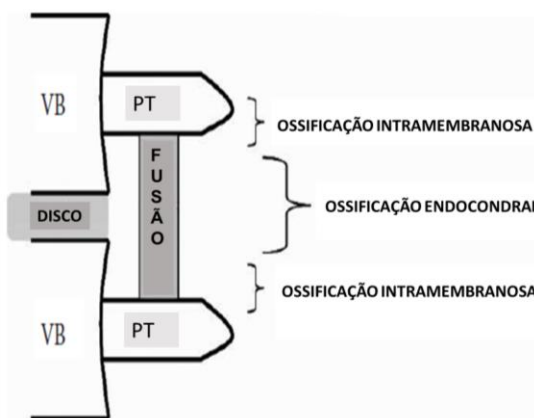


Figura 3 : Processos de ossificação na artrodese vertebral. Esquema mostrando a região, da massa de fusão, onde predominam os diferentes dos tipos de ossificação envolvidos na fusão posterolateral da coluna. VB: vértebra; PT: processo transverso; Fusão: massa de fusão formada (Adaptado de Park et al., 2017).

Conti (2006) demonstrou que a decorticação dos processos transversos pode influenciar no tipo de ossificação e na quantidade de tecido ósseo neoformado. Esse estudo, realizado em modelo murino, observou que a exposição da porção trabecular dos processos transversos levou a predominância do processo de ossificação intramembranoso e maior quantidade de osso neoformado. Dessa forma, fica evidente que a decorticação do processo transverso tem importante impacto na incorporação do enxerto aplicado. A exposição do osso subcondral aumenta o contato na interface enxerto-osso, o que favorece a transferência nutricional, de oxigênio e moléculas osteoindutoras, viabilizando uma ossificação mais rápida e mais exuberante (CONTI et al., 2006; REID et al., 2011).

Em seres humanos, o processo de consolidação da massa de fusão dura aproximadamente 6 meses, enquanto em ratos, a maioria dos trabalhos avalia a fusão entre 6 e 8 semanas, sendo reportado que este processo dura aproximadamente 4 semanas. Abe e colaboradores (2007) evidenciaram tal fato ao relatar que a taxa de fusão se mantinha

constante em 86% dos casos, ao analisar a fusão, em ratos, quatro e seis semanas após a cirurgia de fusão (ABE et al., 2007; ISHIDA et al., 2016).

Uma vez que o processo de fusão depende fortemente do componente biológico, fatores inerentes ao pacientes como idade, diabetes, obesidade, tabagismo, alterações vasculares e osteoporose, entre outros, comprometem biologicamente a capacidade de estruturação dessa ponte óssea, tornando o insucesso da cirurgia de coluna uma condição especialmente grave (REID et al., 2011; LEVEN et al., 2016). Neste sentido, a osteoporose tem se tornando um fator de risco particularmente importante, devido ao aumento da sua prevalência e a tendência mundial de aumento da expectativa de vida (GLASSMAN et al., 2009; LEVEN et al., 2016).

1.2 Osteoporose

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico de prevalência crescente, caracterizada pela presença de ossos porosos, devido à redução da massa óssea e perda da microarquitetura desse tecido. Estas alterações levam à redução da força óssea, aumentando o risco de fraturas (PHETFONG et al., 2016, CHAKRABORTY et al., 2017). O comportamento clínico da osteoporose é o de uma doença silenciosa que se manifesta tardiamente com fraturas por traumas de baixa energia, relacionados a atividades cotidianas (GALI, et al., 2001).

O diagnóstico da osteoporose e a predição do risco de fratura é realizado, principalmente, pela determinação da densidade mineral óssea (DMO), através do exame de absorptometria de raios-x em duas energias (DXA, do inglês *dual energy X-ray absorptiometry*), popularmente conhecido como densitometria óssea. Segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), os resultados de densitometria da coluna lombar, quadril e fêmur são apresentados em *T-scores*, que representam a comparação com o pico de densidade óssea de indivíduos jovens. Quando o valor se encontra dentro de até 1 desvio

padrão (DP) é considerada densitometria normal, entre 1.0 e 2.5 DP, osteopenia e acima de 2.5 DP o diagnóstico de osteoporose é estabelecido. A presença de fraturas típicas de baixa energia, também estabelece o diagnóstico (WHO, 1994).

Aproximadamente 200 milhões de mulheres sofrem de osteoporose no mundo (HERNLUND et al., 2013). Trata-se de uma doença crônica cuja prevalência aumenta de acordo com o envelhecimento populacional. Esta correlação entre osteoporose e envelhecimento fica evidente ao se relatar que, nos Estados Unidos, 17-20% das mulheres com mais de 50 anos, 26% das mulheres com mais de 65 anos e 50% das mulheres com mais de 85 anos apresentam a doença (CLOYD et al., 2008; PARK et al., 2011; PARK et al., 2017).

No Brasil, o Estudo Brasileiro de Osteoporose (BRAZOS) através de um inquérito domiciliar, incluindo 1.695 mulheres de todo país, relatou prevalência de 15,1% desta doença, diagnosticadas pela ocorrência de fraturas por trauma por baixo impacto (PINHEIRO et al., 2010). Em 2010, o mesmo grupo conduziu um estudo transversal intitulado SAPOS (*São Paulo Osteoporosis Study*), onde observaram 4.332 mulheres com idade acima de 40 anos e a prevalência de osteoporose, diagnosticada pelo DXA, foi de 33% (PINHEIRO et al., 2010). A discrepância encontrada nos diferentes estudos reflete a dificuldade em diagnosticar esta doença no Brasil, devido ao seu caráter silencioso e a falta de iniciativas nacionais de rastreio da doença (BACCARO et al., 2015).

O Sistema Único de Saúde (SUS) gastou cerca de 34 milhões e o Sistema Suplementar de Saúde gastou R\$ 12 milhões, no período entre julho de 2003 e junho de 2004, apenas com fraturas osteoporóticas do quadril (OLIVEIRA et al., 2004; BACCARO et al., 2015; SOUZA et al., 2017). Portanto, pode-se afirmar que a osteoporose é uma doença com alto custo econômico e social (MORAES et al., 2014).

1.2.1 Etiologia da osteoporose.

A constituição da massa óssea de um indivíduo saudável se eleva desde a infância até 25 a 30 anos de idade, quando atinge um pico de acumulação e, posteriormente, ocorre uma queda gradual. Fatores genéticos, raciais, nutricionais, exposição solar, atividades físicas e, sobretudo, hormonais regulam esse processo. Durante o envelhecimento, observa-se uma redução progressiva do estoque ósseo. Em mulheres, a queda hormonal relacionada à menopausa, acelera o processo e, quando associado à falta de atividade física ou a sarcopenia, aumenta a propensão a fraturas osteoporóticas (SILVA et al., 2006; CHAKRABORTY et al., 2017).

A osteoporose pode ser classificada em dois tipos: primária ou secundária. A primária é o tipo mais comum, sendo classificada em tipo I ou tipo II (CLOYD et al., 2008). A osteoporose primária do tipo I também pode ser chamada de osteoporose pós-menopausa. Mulheres que recentemente entraram na menopausa, apresentam acentuada perda de massa óssea, resultante da brusca redução nos níveis de estrogênio. Já o tipo II, é também conhecido como osteoporose senil, sendo resultado do processo natural de envelhecimento.

A osteoporose secundária ocorre como consequência de algumas condições clínicas, como hipertireoidismo, hiperparatireoidismo ou doenças inflamatórias, ou devido ao uso crônico de certas substâncias como corticoides e álcool, entre outros (GALI, 2001).

1.2.2 Fisiopatologia da osteoporose.

O osso é um tecido ativo, que sofre uma série de adaptações ao longo da vida de um indivíduo, de forma a manter sua integridade e regular a homeostasia mineral. Para tanto, é necessária uma atividade biológica extremamente dinâmica de renovação óssea, mantendo o esqueleto adequado ao suporte de cargas e novas tensões. Esse processo é chamado de

remodelamento ósseo. Vários tipos celulares participam desse processo, sendo os dois principais, o osteoblasto e o osteoclasto (BOSKEY et al., 2017).

Os osteoblastos se originam de células estromais da medula óssea. Sua diferenciação e função são estritamente reguladas por fatores locais e sistêmicos, incluindo o paratormônio, uma vez que estas células expressam o receptor de paratormônio em sua membrana (WENG et al., 2019). Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação óssea, através da síntese das proteínas da matriz extracelular e da mineralização desta matriz. A produção de matriz orgânica, formada principalmente por colágeno do tipo I, é acompanhada pela deposição de íons de cálcio e fosfato, chamada de matriz inorgânica do osso, ao que se denomina mineralização primária. Durante este processo, há a secreção de fosfatase alcalina que serve como um marcador de formação óssea (RAGGATT et al., 2010). Espacialmente, alguns osteoblastos, que participam do processo de mineralização primária, ficam encarcerados no centro dessa matriz inorgânica, passando a ser chamados de osteócitos. Essas células possuem processos celulares longos, formando uma rede extracelular comunicante, conectando-os a osteoblastos ativos que estão na periferia. Os osteócitos assumem a importante função de sinalizar mudanças na transmissão de carga e outras funções de homeostasia óssea, orientando adequações na formação e remodelamento do osso (KULAR et al., 2012).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, de origem hematopoiética. Sua principal função é degradar a matriz óssea, reabsorvendo o esqueleto e liberando os íons para a corrente sanguínea. Localizados nas lacunas de reabsorção, ou de Howship, essas células estabelecem um microambiente isolado, na interface das suas bordas em escova com a matriz óssea. Nesse compartimento ocorre a liberação de enzimas proteolíticas e íons de hidrogênio que degradam a matriz óssea, liberando os íons de cálcio e fósforo, e o colágeno que os conectava. O telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-I) é uma fração carboxi-terminal do colágeno tipo I, resultante da degradação do colágeno durante a reabsorção óssea,

sendo liberado nesse processo e utilizado como marcador bioquímico do processo de reabsorção óssea (RAGGATT et al., 2010; KULAR et al., 2012; CARVALHO et al., 2016).

O processo de remodelamento ósseo se inicia com o recrutamento e a ativação dos osteoclastos que reabsorvem o osso, formando a unidade de remodelação óssea (BRU, do inglês *bone remodeling unit*). A seguir, células mononucleares de origem ainda desconhecida, removem os fragmentos de colágeno degradado remanescentes, preparando a superfície óssea para a fase de formação óssea. Terminada a fase de reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose e ocorre a proliferação de progenitores de osteoblastos que migram para a BRU onde se diferenciam em osteoblastos ativos. Inicia-se então a fase terminal, caracterizada por osteoformação, que é a fase mais lenta do processo (**Figura 4**). Em ossos esponjosos este ciclo dura cerca de 200 dias, enquanto no osso cortical o processo dura em média 150 dias (RAGGATT et al., 2010; KULAR et al., 2012).

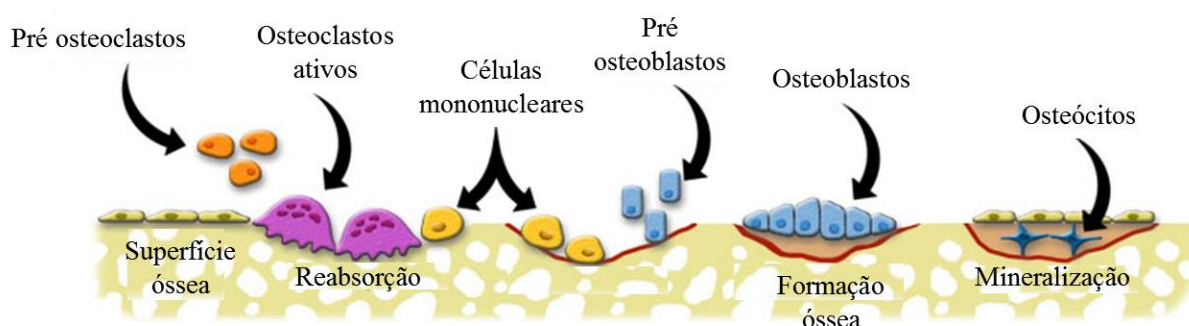


Figura 4: Remodelamento ósseo. Figura esquemática ilustrando as diferentes fases do remodelamento ósseo. Os osteoclastos originam-se de células tronco hematopoiéticas e, uma vez ativados, são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. Após a reabsorção, células mononucleares absorvem os restos produzidos por esta degradação. A seguir, os osteoblastos são recrutados para a unidade de remodelamento ósseo, onde dão início a deposição da matriz orgânica e inorgânica. Por fim, alguns osteoblastos permanecem presos na matriz óssea recém formada, dando origem aos osteócitos (Adaptado de www.orthopaedicsone.com).

O remodelamento ósseo é um processo estritamente coordenado, de forma a manter o equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea. Desregulações neste mecanismo levam a patologias como osteopetrose e osteoporose (RAGGATT et al., 2010).

Na osteoporose, observa-se um desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea, predominando, por diversos fatores, o processo de reabsorção. Isso leva a uma redução do número e espessura de trabéculas, alterações da microarquitetura óssea e redução da densidade mineral, resultando em fragilidade óssea.

Em seres humanos, a perda óssea tem início volta dos 40 anos de idade e, entre as mulheres, essa perda acentua-se entre 5 e 10 anos após a menopausa (RIGGS et al., 2002; PARK e CHUNG, 2011; TELLA et al., 2014). No sexo feminino, o estrogênio modula o crescimento e a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos. Na presença de estrógeno, os osteoblastos e seus percussores inibem a ativação e diferenciação de osteoclastos. Ainda assim, a principal influência do estrogênio sobre o tecido ósseo é na inibição da reabsorção óssea, através da apoptose dos osteoclastos. Durante a menopausa, com a falência ovariana característica e redução drástica nos níveis de estrogênio, observa-se um aumento no número e na atividade dos osteoclastos, resultando em perda de massa óssea e maior susceptibilidade a fraturas (RIGGS et al., 2002; TABATABAEI-MALAZY et al., 2017).

As alterações na estrutura óssea e no remodelamento ósseo, induzidas pela osteoporose, influenciam diretamente nos processos de consolidação e neoformação óssea. Dessa forma, os procedimentos ortopédicos realizados nesta população devem levar em consideração tal condição, sendo necessárias estratégias para aumentar o sucesso de tais procedimentos.

1.2.3 Osteoporose e cirurgias de fusão vertebral

Com o aumento mundial da expectativa de vida da população, surge a necessidade de oferecer recursos médicos que mantenham a população com boa qualidade de vida. Nesse sentido, novas técnicas cirúrgicas de artrodese vertebral tornam este procedimento mais confortável e aplicável a estes pacientes, principalmente para o tratamento de doenças

degenerativas, traumáticas e tumorais da coluna vertebral. Cabe ressaltar que, entre idosos, essas patologias frequentemente apresentam maior gravidade e cirurgias mais extensas são necessárias (CLOYD et al., 2008; GLASSMAN et al., 2009; CULLER et al., 2017; KYUN et al., 2018).

Nos últimos 20 anos, observou-se um aumento no número de pacientes com osteopenia ou osteoporose submetidos a cirurgias de coluna. Chin e colaboradores (2007) encontraram que a prevalência de osteoporose entre pacientes com mais de 50 anos submetidos à ACV foi de 14,5% para homens e 51,3% para mulheres (CHIN et al., 2007). Outro estudo, também considerando mulheres com mais de 50 anos submetidas a cirurgias de fusão, reportou que 46% apresentavam osteopenia e 31% apresentavam osteoporose (CZYZ et al., 2017).

Sabe-se que, a coluna vertebral, sobretudo na transição toracolumbar, é o local mais frequente de fraturas osteoporóticas. A baixa DMO está relacionada ao mal resultado cirúrgico de pacientes submetidos a procedimentos de fusão da coluna com instrumentação. Soltura de implantes, doença do nível adjacente à montagem e novas fraturas vertebrais, são complicações frequentes nesse grupo de pacientes (SKRIPITZ et al., 2001; CHAUDHARY et al., 2017). Nesse sentido, a utilização de múltiplos pontos de fixação, montagens híbridas e cimentação de implantes, são recursos utilizados para otimização biomecânica da massa de fusão óssea que irá se formar (BOGUSZEWSKI et al., 2011; CLOYD et al., 2008; KYUN et al., 2018; PONNUSAMY et al., 2011).

Ainda assim, pacientes osteoporóticos tem menor capacidade biológica na formação de massa de artrodeses. Isso se deve à pobre vascularização do leito de fusão, menor disponibilidade de enxerto autólogo e a osteoblastos menos eficientes na formação de osso novo. Esses fatores contribuem para maiores taxas de atraso de consolidação, fadiga de implantes e pseudartrose, tornando o sucesso da ACV um desafio ao cirurgião (KAMMERLANDER et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2017).

Park e colaboradores (2017) avaliaram o processo de artrodese vertebral em ratas osteoporóticas e não osteoporóticas, e observaram que a osteoporose resultava em atraso na formação da massa de fusão. A avaliação temporal dessa massa de fusão sugeriu que os animais osteoporóticos apresentavam prejuízo em diversas etapas da consolidação óssea, com comprometimento da ossificação intramembranosa, endocondral e da maturação óssea, principalmente (PARK et al., 2017).

Diversas publicações apontam que as alterações celulares resultantes da depleção de estrogênio, levam a redução da atividade dos osteoblastos e da osteoblastogênese, assim como ao aumento da atividade dos osteoclastos e da osteoclastogênese, influenciando negativamente o processo de formação da massa de fusão após procedimento de artrodese vertebral. Nesse sentido, estratégias que estimulem os estágios iniciais e intermediários da fusão óssea em indivíduos osteoporóticos podem evitar falha biológicas neste processo (SILVA et al, 2006; CHAUDHARY et al., 2017; PARK et al., 2017).

Ainda que não haja clara evidência de que a consolidação mais precoce da artrodese represente um benefício clínico e funcional real na população geral, quando se considera a população idosa, onde se observa maior incidência de eventuais quedas, osteoporose e sarcopenia, a aceleração da consolidação pode representar a redução da necessidade de reoperações (PARK et al., 2017)

Objetivando potencializar os aspectos biológicos relacionados à fusão vertebral, medidas terapêuticas como o uso tópico de proteínas morfogênicas ósseas (BMPs, do inglês *bone morphogenic proteins*) e a utilização de medicações, como as utilizadas no tratamento de osteoporose, foram avaliadas (MORIMOTO et al., 2015; LIU et al., 2018). As BMPs foram amplamente estudadas e apresentam diversas limitações à sua ampla utilização, entre elas o alto custo. Nesse cenário, a terapia com administração intermitente de teriparatida, que já é mundialmente utilizada como droga de segunda linha no tratamento de osteoporose grave, parece uma opção mais viável (CAMPBELL et al., 2015; KALIYA-PERUMAL et al., 2017).

1.3 Teriparatida

O paratormônio é o hormônio produzido pelas glândulas paratireóides que age fisiologicamente na regulação dos níveis de cálcio plasmático. Trata-se de um polipeptídeo contendo 84 aminoácidos, cuja meia vida plasmática dura apenas 4 minutos. Seu mecanismo de ação envolve o aumento da absorção gastrointestinal e da reabsorção renal de cálcio (QIN et al., 2004; ASPENBERG et al., 2010). No tecido ósseo, níveis mantidos de PTH estimulam a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL) e a formação de novos osteoclastos, ativando a degradação óssea e mobilizando os estoques ósseos de cálcio (POOLE et al., 2005; LEE et al., 2009).

A Teriparatida (PTH 1-34rh, referido neste trabalho como PTH) é um polipeptídeo sintético, que contém os 34 aminoácidos responsáveis pela ação do paratormônio humano. Em relação ao seu efeito no tecido ósseo, a teriparatida apresenta um mecanismo de ação singular: sua administração contínua está associada a efeitos osteocatabólicos, levando a uma redução do volume ósseo; enquanto a administração intermitente provoca efeitos osteoanabólicos, caracterizados pelo aumento na formação de osso trabecular (CHAUDHARY et al., 2017). Uma vez que o tratamento intermitente leva ao aumento da massa óssea e reduz o risco de fraturas osteoporóticas, este fármaco foi aprovado para tratamento de osteoporose grave. É importante ressaltar, que o PTH é o medicamento osteoanabólico mais amplamente utilizado para tratamento da osteoporose (CHAUDHARY et al., 2017).

Desde 1976, quando foi utilizado clinicamente pela primeira vez, o PTH vem apresentando boa segurança clínica (REEVE et al., 1976; POOLE et al., 2005). A terapia intermitente com PTH provoca aumento da massa óssea global e restauração da microarquitetura óssea. São descritos importantes ganhos na DMO, sobretudo na coluna vertebral e fêmur proximal e, conseqüentemente, prevenção de fraturas vertebrais em

pacientes osteoporóticos (ASPENBERG et al., 2010; CAPRIANI et al., 2012; KLEEREKOPER et al., 2014).

A dose recomendada em humanos é de 20-40 µg/dia, para a terapia intermitente, tendo pico de ação em 30 minutos e se tornando indetectável no plasma após cerca de três horas de sua aplicação, não havendo acúmulo com o tratamento (BLUMSOHN et al., 2011; BOUILLON et al., 2015). Assim como a forma intacta da molécula de paratormônio, sua ação principal, em terapia intermitente, é aumentar o número, a atividade e o tempo de vida de osteoblastos, sobretudo no osso trabecular (SKRIPITZ et al., 2000; CAMPBELL et al., 2015).

Em 2004, um estudo toxicológico conduzido por Vahle e colaboradores (2004), utilizando modelo de ratos, demonstrou o aumento do número de casos de osteossarcoma associado ao uso de PTH. A revisão desses dados apontou que as doses e o tempo de exposição aplicados eram muito elevados e não poderiam ser extrapolados para seres humanos (VAHLE et al., 2004). Além disso, na condição clínica de hiperparatireoidismo primário, onde ocorre elevação sustentada dos níveis plasmáticos de paratormônio, não há associação com o surgimento de osteossarcoma. Posteriormente, estudos realizados em macacos e a ampla utilização clínica deste medicamento, não revelaram associação com a formação tumoral (VAHLE et al., 2008; CAPRIANI et al., 2012). Ainda assim, outros trabalhos apontam que a exposição mais limitada é a medida mais segura (HARPER, 2007).

Mais de um milhão de indivíduos já fizeram uso do PTH. Há também um robusto corpo de publicações avaliando seu efeito osteoanabólico como adjuvante ao tratamento de fraturas e em cirurgias que envolvam a formação óssea. Alguns trabalhos avaliaram a aplicação do PTH na cirurgia de fusão vertebral, osteonecrose de mandibular, artroplastias e no tratamento de doenças como osteogênese imperfecta (ASPENBERG et al., 2010; CAPRIANI et al., 2012; KLEEREKOPER et al., 2014; LIU et al., 2018).

1.3.1 Uso nas cirurgias de fusão

Os efeitos anabólicos do PTH fornecem o racional para uso deste medicamento como adjuvante em situações que envolvam neoformação óssea. Os benefícios à microarquitetura óssea e à capacidade regenerativa do osso levaram alguns pesquisadores a avaliar o impacto da utilização de PTH, de forma intermitente, nas cirurgias de fusão vertebral (LIU et al., 2018).

A literatura é unânime em evidenciar que, tanto em modelos animais, quanto em pacientes, o PTH acelera o processo de artrodese, assim como leva a formação de massas de fusão mais robustas e estruturalmente melhores (LAWRENCE et al., 2006; ABE et al., 2007; FISCHER et al., 2016; MARTIN-FERNÁNDEZ et al., 2018).

Lawrence e colaboradores (2006) foram pioneiros em avaliar o impacto da terapia intermitente com PTH sobre a massa de fusão vertebral, utilizando o modelo de artrodese posterolateral em ratos. Neste estudo, foi demonstrado que doses diárias de 10 µg / kg / dia, por 6 semanas, aumentavam a taxa de fusão (LAWRENCE et al., 2006).

Abe e colaboradores (2007) utilizando um modelo com ratos machos não osteoporóticos, realizaram uma importante avaliação de diversos aspectos biológicos da formação da massa de fusão vertebral. Observaram que, assim como outros trabalhos que avaliavam o reparo de fraturas, o efeito da terapia com PTH, de forma intermitente, acelerava o processo de formação da massa de fusão. O grupo de estudo utilizou a dose de 40 µg / kg / dia e aos 14 dias já apresentava taxas de fusão superiores ao controle (57% vs 14%), com massas de fusão mais volumosas e densas e com maior reabsorção do enxerto aplicado, um fator essencial para a remodelação óssea e a consolidação final. Dessa forma, apontaram que a terapia com PTH poderia ser uma importante ferramenta para otimizar artrodeses em ossos osteoporóticos (ABE et al., 2007).

O'Loughlin e colaboradores (2009) avaliaram a utilização de 10 µg / kg / dia, em coelhos machos saudáveis e documentaram o aumento da taxa de fusão e o predomínio do processo de formação óssea endocondral no grupo tratado. Esse trabalho propôs que a terapia com PTH fosse avaliada em paciente com alto risco de pseudoartrose, como fumantes, diabéticos e usuários de glicocorticóides (O'LOUGHLIN et al., 2009).

Ming e colaboradores (2012) avaliaram o efeito do PTH sobre a massa de fusão. A comparação entre ratos submetidos à ACV, tratados com altas doses (23 µg / kg / dia) ou baixas doses (4 µg / kg / dia) de PTH, revelou que o tratamento com doses mais elevadas resultava em maior taxa de fusão e maior taxa de deposição mineral no sítio de fusão, indicando um efeito dose dependente (MING et al., 2012).

Recentemente, dois trabalhos que utilizaram o modelo de fusão vertebral com ratas osteoporóticas, sugeriram que o PTH otimizava a taxa de deposição mineral e a formação da camada cortical no sítio de fusão (QIU et al., 2013; YISHAKE et al., 2018).

Alguns estudos clínicos prospectivos e retrospectivos foram conduzidos avaliando o impacto da terapia intermitente com PTH em humanos. Verificou-se importantes benefícios à microarquitetura óssea, reduzindo a taxa de soltura de implantes e pseudoartrose. Esses trabalhos confirmam a redução da taxa de reoperação e fratura de nível adjacente e a otimização da recuperação funcional pós-operatória. No entanto, ainda não há consenso quanto a duração e quanto ao melhor momento para início esta terapia (OHTORI et al., 2012; OHTORI et al., 2015; LIU et al., 2018).

É importante ressaltar, que em todos os estudos realizados utilizando a terapia com PTH para otimizar a fusão vertebral, tanto em modelos animais quanto em pacientes, o tratamento foi iniciado imediatamente após o procedimento cirúrgico. Uma vez que o tratamento com PTH pode modular diferencialmente as diversas etapas do processo de fusão, a literatura ainda carece de estudos que avaliem a duração ideal e o melhor momento para início do tratamento.

1.4 Modelos animais em ortopedia

1.4.1 Modelo de osteoporose induzida por ooforectomia

O uso de modelos animais tem sido amplamente aplicado nos diversos ramos da medicina, auxiliando na compreensão de mecanismos básicos e características clínicas das mais diversas doenças (SCHIMANDLE et al., 1994). Devido a sua alta prevalência e custos, tanto social quanto financeiro, uma maior compreensão da osteoporose se torna imperativa. Neste sentido, o uso de modelos experimentais animais permite, não só a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos desta doença, como também o estudo de agentes farmacológicos para tratamento da doença (LELOVAS et al., 2008).

O modelo animal de osteoporose em ratas induzido por ooforectomia (remoção dos ovários) é um modelo consolidado, reprodutível e amplamente estudado, sendo o modelo animal de osteoporose mais frequentemente utilizado (TURNER, 2001; LASOTA et al., 2004; PARK et al., 2017). Este modelo mimetiza o efeito da privação do estrogênio sobre o tecido ósseo, reproduzindo as alterações ósseas observadas na menopausa e na ooforectomia em mulheres. Tal modelo utiliza ratas com maturidade sexual e esquelética que respondem de forma adequada à depleção de estrogênio, causada pela remoção dos ovários, manifestando as alterações ósseas decorrentes desta depleção em aproximadamente 1 mês (BONUCCI et al, 2014).

A ooforectomia provoca nas ratas intensa reabsorção óssea e distúrbios de mineralização por mecanismos patológicos similares aos da osteoporose primária tipo I. Efeitos como ganho de massa corporal e redução da absorção intestinal de cálcio também são comuns entre a doença em humanos e o modelo experimental (TURNER, 2001; DRESPE et al., 2005).

A partir da remoção dos ovários, observa-se uma rápida perda de osso trabecular e de massa óssea, que são mensurados através da avaliação da fração de volume ósseo (BV/TV) na porção trabecular dos ossos. A perda óssea é caracterizada pela redução no número de trabéculas (Tb.N) e aumento do espaçamento entre trabéculas (Tb.Sp) devido ao aumento da atividade osteoclástica (YOON et al., 2012). Entretanto, este modelo murino de osteoporose, não reproduz naturalmente a fragilidade óssea observada em seres humanos. Portanto, a avaliação do efeito da ooforectomia sobre a força óssea deve ser realizada através de testes biomecânicos (BONUCCI et al, 2014).

A perda óssea não ocorre de forma homogênea ao longo do esqueleto, ocorrendo inicialmente na tíbia, seguido da vertebra e fêmur. Indiretamente, as alterações ósseas observadas nos diferentes modelos de osteoporose podem ser medidas através da mensuração dos níveis plasmáticos de marcadores de reabsorção óssea, como CTX-1, um produto da degradação do colágeno. O acompanhamento da variação dos níveis de tais marcadores também permite avaliar a resposta a tratamentos para a osteoporose (YOON et al., 2012; BONUCCI e BALLANTI, 2014; KOMORI, 2015; SHETTY et al., 2016).

1.4.2 Modelos de fusão posterolateral

Modelos animais de fusão vertebral fornecem importantes informações biológicas, radiológicas e histológicas sobre o processo de formação da massa de fusão (PARK et al., 2017). Ainda que tais modelos apresentem como limitação o fato de não reproduzirem os aspectos biomecânicos observados em seres humanos, eles têm sido amplamente utilizados por permitirem a avaliação de diferentes estratégias para potencializar a fusão óssea e a influência de diferentes fatores na formação da massa de fusão (ABE et al., 2007; PARK e CHUNG, 2011).

Já foram descritos modelos utilizando camundongos, ratos, coelhos, cachorros, porcos, ovelhas e cabras. Estudos pré-clínicos para “prova de conceito” e avaliação de aplicabilidade e eficácia de novos implantes ou abordagens farmacológicas para aumentar a taxa de fusão, são geralmente realizados em modelos com animais menores, progredindo para animais maiores de acordo com as evidências e resultados alcançados. O uso destes modelos permite a utilização de diferentes abordagens para a avaliação qualitativa e quantitativa da massa de fusão, podendo esta ser avaliada por ensaios mais simples como a avaliação manual da fusão e avaliações radiográficas e por ensaios mais apurados e específicos como histologia, microtomografia, biomecânica e análises moleculares (MORONE et al., 1998; DRESPE et al., 2005).

Os diferentes modelos apresentam suas peculiaridades e o procedimento deve ser muito bem controlado para evitar conclusões equivocadas. Um exemplo é o uso de enxerto autólogo, uma vez que já foi demonstrada uma relação dose dependente entre a quantidade de enxerto e a formação da massa de fusão. Dessa forma, torna-se um requisito imprescindível a padronização da quantidade e fonte de enxerto utilizada, o mesmo sendo observado em relação aos diversos outros fatores que influenciam na formação da massa de fusão como tempo de avaliação, alimentação dos animais, controle dos fatores de estresse animal (ABE et al., 2007; ISHIDA et al., 2016; MORRIS et al., 2018).

Em modelos de rato, a principal técnica utilizada é a posterolateral. Uma metanálise de Ishida e colaboradores (2016) identificou que neste modelo, fatores como idade, peso, sexo, tipo e quantidade de enxerto influenciam diretamente nas taxas de fusão (ISHIDA et al., 2016).

A maioria dos trabalhos que utilizam o modelo de fusão posterolateral em ratos, avaliam a fusão entre 6 e 8 semanas após a realização da cirurgia. Contudo, já foi demonstrado que se a fusão não ocorrer até a quarta semana após a cirurgia, não são

observados aumentos na taxa de consolidação em tempos maiores (PARK e CHUNG, 2011; PARK et al., 2016, PARK et al., 2017).

Outro aspecto interessante, é a possibilidade de combinação de diferentes modelos. Neste sentido é possível, por exemplo, estudar o impacto de doenças de base, como diabetes ou osteoporose, no processo de fusão vertebral, assim como investigar abordagens que venham a aumentar as taxas de sucesso deste procedimento que possam futuramente ser aplicadas em pacientes (PARK et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A formação da massa de fusão é um processo biologicamente complexo e bastante regulado. As características intrínsecas dos pacientes influenciam diretamente neste processo. Dessa forma, o crescente aumento da prevalência da osteoporose, torna a aplicação das cirurgias de artrodese nesta população um desafio. Medidas osteoanabólicas como o uso de teriparatida de forma intermitente, podem reduzir as taxas de falha desses procedimentos. Entretanto, não há consenso quanto ao tempo de uso dessa terapia, nem quanto ao melhor momento para que ela seja iniciada. Levando em consideração questões relacionadas ao uso seguro deste medicamento, custos e adesão ao tratamento, que requer injeções subcutâneas diárias, identificar o momento ideal para início desta terapia, assim como avaliar terapias de curto prazo, que mantenham o efeito benéfico desta terapia, são desejados. Portanto, este projeto pretende investigar o efeito modulador da terapia intermitente com PTH nas etapas iniciais e tardias do processo de formação da massa de fusão, a fim de identificar o melhor momento para o início deste tratamento em pacientes osteoporóticos submetidos a cirurgia de artrodese da coluna vertebral. Através de um estudo em modelo pré-clínico, pretendemos avaliar, conceitualmente, qual a forma mais eficaz da utilização da terapia PTH aplicável ao pós-operatório de artrodese da coluna osteoporótica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com teriparatida, de início precoce ou tardio, sobre os aspectos biológicos da fusão vertebral induzida em biomodelo de osteoporose.

3.2 Objetivos específicos

1. Induzir a osteoporose em ratas Sprague Dawley através da realização de ooforectomia;
2. Realizar a cirurgia de fusão vertebral em ratas osteoporóticas
3. Determinar, através do ensaio de palpação manual, a taxa de fusão nos diferentes grupos;
4. Avaliar, por radiografia , a formação de fusão óssea estável;
5. Avaliar, por microtomografia, aspectos qualitativos e quantitativos da massa de fusão nos diferentes grupos.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho experimental

Este protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da instituição. Parecer 007/2018 (Anexo I).

Foram utilizadas 27 ratas da linhagem Sprague-Dawley obtidas do biotério da UERJ. Aos sessenta dias de vida, todas as ratas foram submetidas ao procedimento de ooforectomia, para remoção dos ovários e consequente indução da osteoporose. Seis semanas após a cirurgia de ooforectomia, as ratas foram submetidas à cirurgia de artrodese lombar, sendo então alocadas nos seguintes grupos experimentais: grupo controle, composto por 5 ratas, que não foram tratadas com teriparatida (Eli Lilly, São Paulo, SP, Brasil); grupo PTH 1-15, contendo 8 ratas, que receberam 30 µg / kg de teriparatida, uma vez ao dia, por via subcutânea, pela manhã, do dia 1 ao dia 15 pós cirurgia de fusão; grupo PTH 16-30, composto por 6 ratas que receberam 30 µg / kg de teriparatida do dia 16 ao dia 30 pós cirurgia de fusão e, por fim, o grupo PTH 30, no qual 8 ratas foram tratadas com 30 µg / kg teriparatida do dia 1 ao dia 30 após a cirurgia de artrodese lombar. Todos os animais foram eutanasiados cinco semanas após a cirurgia de artrodese lombar (**Figura 5**).

4.2 Manutenção dos animais

Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco®) em Biotério de Experimentação exclusivo para a espécie, sendo submetidos a ciclo de fotoperíodo de 12 horas de luz artificial, seguidas de 12 horas de escuro com temperatura entre 20° C e 22° C e com 50% de umidade relativa. Todos os animais tiveram acesso à água filtrada e ração *ad libitum*.

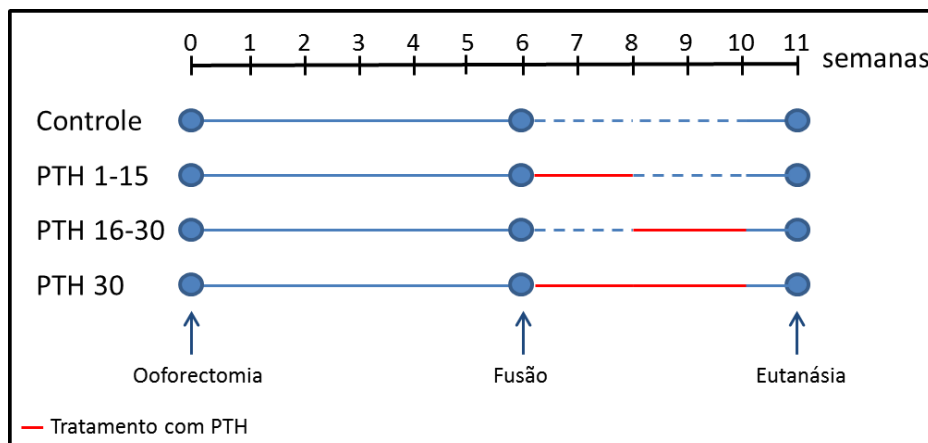


Figura 5 : Desenho experimental do estudo. Os animais foram submetidos a ooforectomia com sessenta dias de vida (tempo 0). Após seis semanas, as ratas foram submetidas à cirurgia de fusão vertebral, sendo alocadas em quatro grupo: grupo controle, que não foi tratado com teriparatida; grupo PTH 1-15, que recebeu 30µg/kg de teriparatida, do dia 1 ao dia 15 pós cirurgia de fusão; grupo PTH 16-30, que recebeu 30µg/kg de teriparatida do dia 16 ao dia 30 pós cirurgia de fusão e o grupo PTH 30, que recebeu 30µg/kg de teriparatida do dia 1 ao dia 30 após a cirurgia de fusão vertebral. Após cinco semanas, todos os animais foram eutanasiados e avaliados quando a formação da massa de fusão.

4.3 Cirurgia de ooforectomia

A indução anestésica foi realizada em câmara de indução com concentração alveolar mínima de isoflurano de 5,0% (CAM50) e a manutenção foi realizada com 2,0% através de máscara facial. Foi utilizado o vaporizador calibrado (Insight Ltda).

Antes do início da cirurgia, os animais receberam 50 mg / kg de cefazolina sódica (Fazolon®, Blau Farmacêutica) administrada por via intraperitoneal e 3 mg / kg de cetoprofeno (Ketoprofeno 1%, Vencofarma) associado a 5 mg / kg de cloridrato de tramadol (Hipolabor) pela via subcutânea, para profilaxia da infecção e controle da dor pós-operatória, respectivamente.

Após indução anestésica, foi realizada tricotomia bilateral na região próxima a última costela. A seguir, foi feita incisão na pele com cerca de 1 cm, por via de acesso lateral, através da qual foi identificada uma massa gordurosa branca localizada abaixo da musculatura abdominal, na região dos flancos. O ovário está localizado nesta massa e, após sua

identificação, ele foi isolado e puxado para fora da cavidade abdominal. Com o auxílio de uma pinça hemostática, o ovário e as trompas foram tracionados, sendo realizada sutura da trompa, seguido de remoção do ovário. Por fim, foi realizada a sutura da parede abdominal. O mesmo procedimento foi repetido no outro lado, para remoção do segundo ovário.

Cerca de seis semanas após a cirurgia, foi realizada coleta de sangue da veia da cauda das ratas ooforectomizadas, para quantificação dos níveis plasmáticos de CTX, como forma de avaliar o estabelecimento da osteoporose. Como controle, foram usadas ratas não ooforectomizadas, pareadas em relação à idade.

4.4 Cirurgia de fusão posterolateral da coluna vertebral

Após o plano anestésico, foi realizada a tricotomia da região dorsal distal, seguido de assepsia da cauda e região lombar distal. A seguir, foi realizado o procedimento de remoção da cauda para obtenção das vértebras caudais que foram utilizadas para preparo dos enxertos exclusivamente ósseos. As vértebras foram fragmentadas mecanicamente com auxílio de pinça goiva e então maceradas com um alicate, sendo preparados dois enxertos de 150 μ g cada.



Figura 6: Preparo do enxerto ósseo autólogo obtido a partir de vértebras caudais. (A) A porção final da cauda (aproximadamente 10 cm) foi coletada, com posterior remoção do tecido cutâneo. (B) As partes moles foram removidas, com o auxílio de um bisturi, seguido de dissecação das vértebras. (C) Vértebras fragmentadas com auxílio de goiva e maceradas com o auxílio de um alicate de pressão.

Sequencialmente, foi realizada uma incisão de pele, com cerca de 4 cm, na linha média dorsal, seguida de duas incisões paramedianas no plano submuscular através das quais

os processos transversais de L4 e L5 foram expostos. Os processos transversais foram descorticalizados com auxílio de pinça goiva e cureta até que o sangramento fosse observado. Posteriormente, o enxerto previamente preparado foi posicionado no sítio de fusão, entre os processos transversos de L4 e L5 bilateralmente. A sutura foi realizada por planos. Os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião.

Os animais foram observados no período pós-operatório imediato, durante 20 minutos, e nos dois dias subsequentes. Foram observados aspectos como mobilidade, aspectos do pelo e postura. Para o controle da dor pós-operatória a mesma dose de cetoprofeno associado à tramadol foi mantida por mais três dias.

4.5 Coleta de amostras

4.5.1 Coleta de sangue e obtenção de plasma

Após a cirurgia, com periodicidade semanal, foi realizada coleta de sangue através punção da veia caudal, utilizando solução de heparina como anticoagulante. Para tal, após indução da anestesia com isoflurano, a veia caudal foi canulada, utilizando catéter intravenoso periférico (Becton Dickinson) e o sangue foi imediatamente transferido para tubos eppendorf contendo heparina. Para obtenção do plasma, os tubos contendo sangue foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi aliquotado e armazenado a -80° Celsius para as análises de ELISA.

4.5.2 Coleta da amostra tecidual

Cinco semanas após a cirurgia de fusão espinhal sob plano anestésico profundo (5% isoflurano por via inalatória) os animais foram eutanasiados através de administração intravenosa de solução saturada de cloreto de potássio (KCl), sob anestesia inalatória. Após a

eutanásia, a coluna vertebral foi cuidadosamente dissecada e o segmento lombar coletado e utilizado imediatamente para análise manual da fusão. Posteriormente foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) para as análises de microtomografia computadorizada (μ CT).

4.6 Quantificação de CTX-I no plasma

A quantificação de CTX-I no plasma foi realizada através do ensaio de ELISA, utilizando o kit específico para CTX-I de rato (Fine Test). Para isso, foram utilizados os plasmas obtidos a partir do sangue dos animais. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e após a leitura da absorbância os resultados foram calculados utilizando o programa Excell (Microsoft™, versão 2013), através da interpolação dos valores obtidos com os valores da curva padrão e expressos em ng/mL.

4.7 Avaliação manual da fusão

O teste de avaliação manual da fusão entre os segmentos L4-L5 foi realizado por três avaliadores experientes de forma independente e cegada em relação aos grupos. Os segmentos lombares recém-coletados foram avaliados quanto a mobilidade intersegmentar entre L4-L5, tendo como referência a mobilidade encontrada entre os segmentos adjacentes. Considerou-se como "fusão", a ausência de mobilidade entre L4 e L5, enquanto a detecção de qualquer movimento entre as facetas uni ou bilateralmente ou entre os processos transversos L4 - L5 foi considerada como "não fusão". A classificação em "fusão" ou "não fusão" foi conferida quando houve concordância entre os avaliadores.

4.8 Análise radiográfica

A fusão óssea entre as vértebras L4 e L5 foi avaliada utilizando as radiografias (Raio-X XR6000, General Electric Company) realizadas logo após a eutanásia dos animais, na quinta semana após a cirurgia de fusão. Estas películas foram avaliadas de forma cega por três observadores independentes. Os avaliadores descreveram os achados radiográficos, como presença de fragmentos de enxerto, aspecto e tamanho da massa óssea formada e presença de linha de radiolucência. A presença de linha de radiolucência bilateral de tamanho considerável e a presença de grande quantidade de enxerto não reabsorvido, foram utilizadas como critério para a classificação dos animais nos grupos "fusão" e "não fusão".

4.9 Análise por microtomografia computadorizada (μ CT).

Os segmentos lombares fixados em solução de PFA 4% foram avaliados por microtomografia. A análise das vértebras foi realizada utilizando o aparelho Bruker SkyScan 1076. Os espécimes foram imersos em água e digitalizados, individualmente, utilizando tamanho de voxel de 9 μ m, sendo estabelecidas as seguintes configurações: 65KV, 381 μ A, 2ms, 2 quadros, 0,3°.

As imagens foram reconstruídas usando o *software NRecon* com coeficiente de atenuação de 0,005534; suavização de 3,0; compensação de desalinhamento de 2,0; redução de artefato de anel 10 e correção de *beam hardening* de 30%. O software *DataViewer* foi usado para realinhar as imagens e os parâmetros quantitativos foram avaliados usando o software *CTan*. Os voxels ósseos foram limitados entre 63 e 255 pela média dos limites automáticos em cada arquivo. A análise quantitativa tridimensional foi feita em diferentes VOIs (volume de interesse, do inglês *volume of interest*) para abranger toda a área de osso novo. Para a análise da qualidade da massa óssea formada, foi utilizado um VOI com dimensão de 0,5mm x 0,5mm x 0,1mm,

posicionado, especificamente, em um local de neoformação óssea, na região dos processos transversos onde mais osso foi formado. Para a análise tridimensional da massa de fusão, foi delineado um VOI global, que incluiu as vértebras usadas no processo de fusão, a partir do qual foram analisados o volume total de osso das vértebras, incluindo o enxerto e o osso neoformado no processo transversal.

Os seguintes parâmetros foram utilizados para a avaliação: volume total (BV), superfície óssea (BS), separação das trabéculas ósseas (Tb. Sb), espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), superfície óssea específica (BS/BV) e fração de volume ósseo (BV/TV)

Estas análises foram realizadas através da colaboração instituída com o Dr. Rafael Senos e o Dr. Kurt Hankenson, da Universidade de Michigan, EUA.

4.10 Análise dos dados

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software GraphPad Prism 5* (GraphPad Software). As diferenças entre os grupos foram analisadas usando ANOVA, ou teste T, quando aplicável. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da osteoporose

Para confirmar a indução da osteoporose, seis semanas após a cirurgia de ooforectomia, os níveis de plasmáticos do marcador de reabsorção óssea CTX-I foram quantificados. Observamos que a quantidade de CTX-I plasmática foi significativamente maior no grupo submetido à ooforectomia ($0,938 \pm 0,055$) em relação a ratas não ooforectomizadas, com idade similar a das ratas utilizadas nos experimentos ($0,734 \pm 0,063$, $P=0,0492$), indicando aumento da reabsorção óssea, característico da osteoporose (Figura 7).

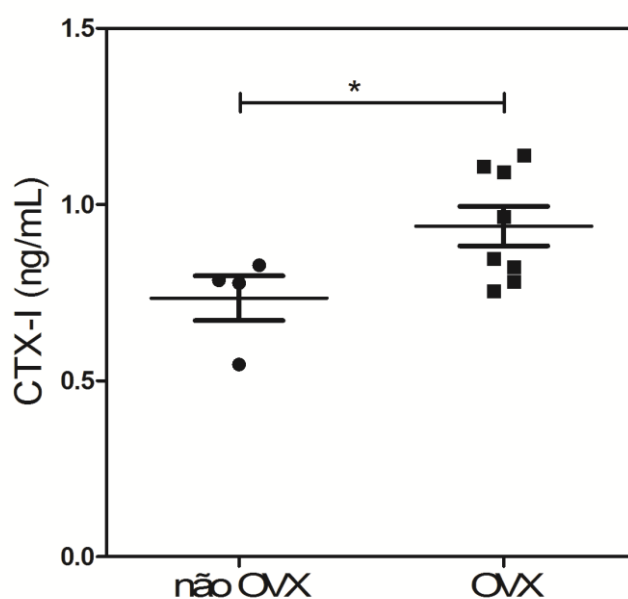


Figura 7: Avaliação da indução de osteoporose. Seis semanas após a cirurgia de ooforectomia, foi realizada a quantificação dos níveis plasmáticos de CTX-I através de ensaio de ELISA. Como controle foram utilizadas ratas não ooforectomizadas, pareadas em relação a idade. Teste-t, $p=0,0492$. Grupo não OVX $n=4$ e grupo OVX $n=8$. * $p < 0,05$

5.2 Avaliação da fusão Vertebral

Seis semanas após indução da osteoporose, as ratas foram submetidas ao procedimento de fusão vertebral L4-L5, sendo submetidas aos diferentes protocolos de tratamento, como anteriormente descrito. Cinco semanas após a cirurgia, todos os animais foram eutanasiados e os segmentos lombares foram analisados.

A avaliação manual da fusão nos segmentos recém-coletados, demonstrou que o grupo PTH 16-30 foi o único grupo a apresentar taxa de fusão de 100% (6/6). Nos grupos controle, PTH 1-15 e PTH 30 o percentual de fusão foi de 80% (4/5), 62,5% (5/8) e 75% (6/8), respectivamente (**Figura 8**).

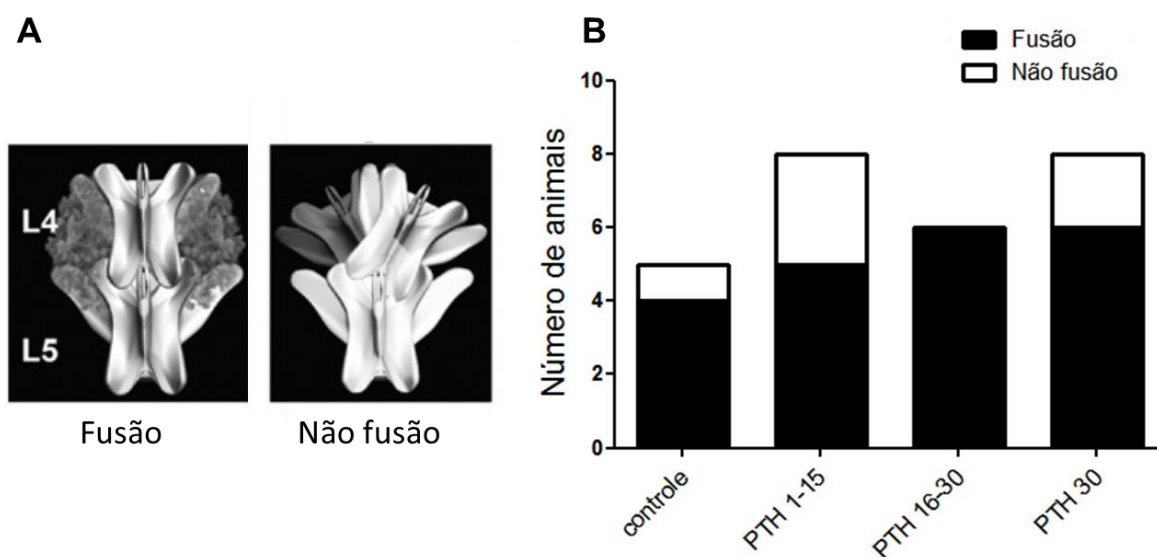


Figura 8: Avaliação manual da fusão. Após a eutanásia dos animais, cinco semanas após a cirurgia de fusão, o fragmento lombar foi cuidadosamente dissecado e coletado. A avaliação de movimentação entre os segmentos L4-L5, foi realizada, levando-se em consideração a mobilidade observada entre as vértebras adjacentes. (A) A presença de qualquer mobilidade foi classificada como não fusão, enquanto a identificação de rigidez entre estes segmentos indicou a presença de fusão óssea (adaptado de Abe et al., 2007) (B) No gráfico, estão apresentados o número de animais de cada grupo que apresentou (preto) ou não (branco) fusão sólida da artrodese.

Conjuntamente, observamos, através da análise radiográfica, percentual de fusão de 60% no grupo controle, 62,5% no grupo PTH1-15, 100% no grupo PTH 16-30 e 75% no grupo PTH 30 (**Figura 9**).

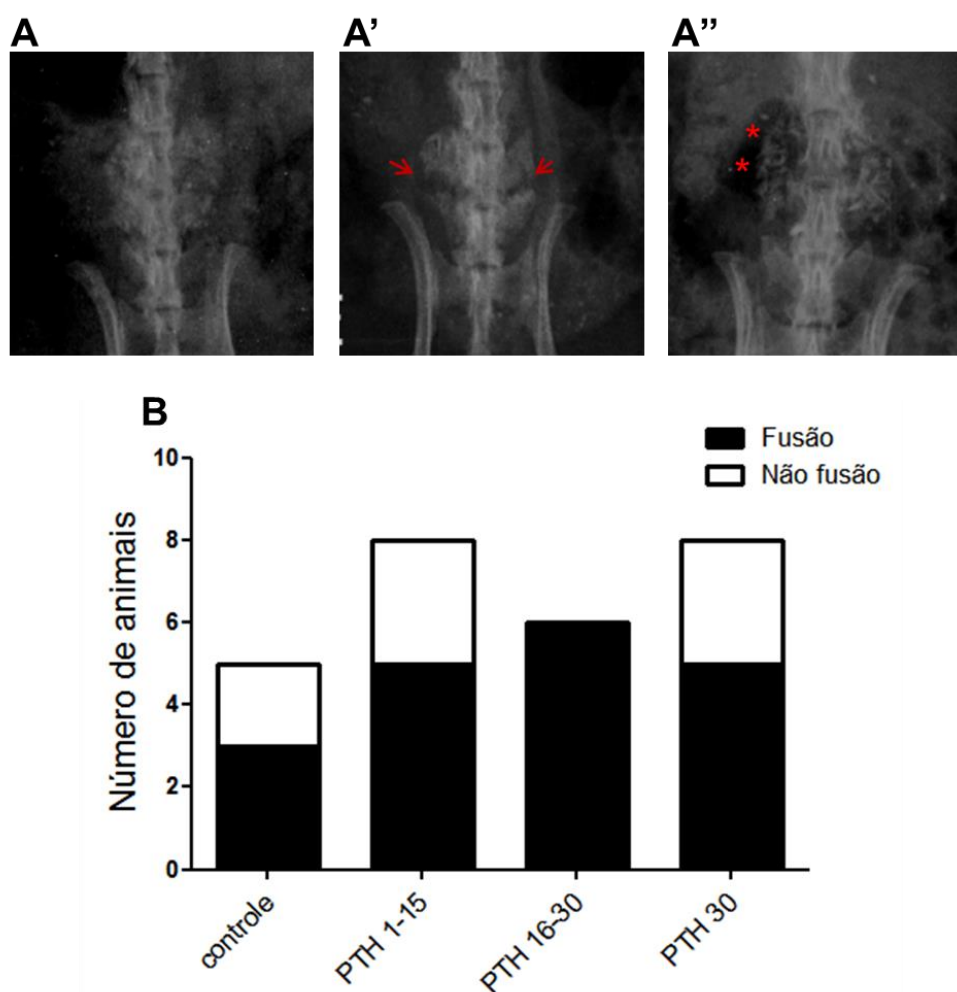


Figura 9: Avaliação radiográfica da fusão. Após a eutanásia dos animais, cinco semanas após a cirurgia de fusão, foram realizadas radiografias do segmento lombar. A avaliação da fusão foi realizada através da observação da presença de ponte óssea robusta, escassez ou ausência de fragmentos de enxerto e ausência de linhas de radiolucência de tamanho expressivo. (A) exemplo de radiografia onde se observa fusão da artrodese; (A') um exemplo de não fusão, devido a presença de linhas radiolucência (setas) entre os processos transversos e (A'') exemplo de não fusão devido a presença de grande quantidade de fragmentos de enxerto (asterisco). (B) No gráfico estão apresentados o número de animais de cada grupo que apresentaram ou não fusão de artrodese de acordo com os critérios radiográficos.

A avaliação radiográfica (5ª semana) evidenciou que três animais do grupo controle apresentaram fusão, de acordo com os critérios radiológicos. Dois animais, no entanto, foram classificados como não fusão, apresentando uma pronunciada linha radioluciente na ponte óssea, indicando que a formação óssea ainda não estava completa (**Figura 10**). Comparativamente, as massas ósseas do grupo controle aparentaram se menores que a dos demais grupos avaliados.

No grupo PTH 1-15, destacava-se grande número de fragmentos de enxerto, evidenciando uma falha ou atraso na reabsorção do mesmo. Além disso, de uma forma geral, a massa óssea apresentou-se desorganizada e bastante espalhada. Neste grupo, através desta análise, três animais foram classificados como "não fusão". Dos cinco animais em que a fusão foi alcançada, dois apresentaram uma linha de radiolucência indicando que a formação óssea ainda estava em andamento (**Figura 10**).

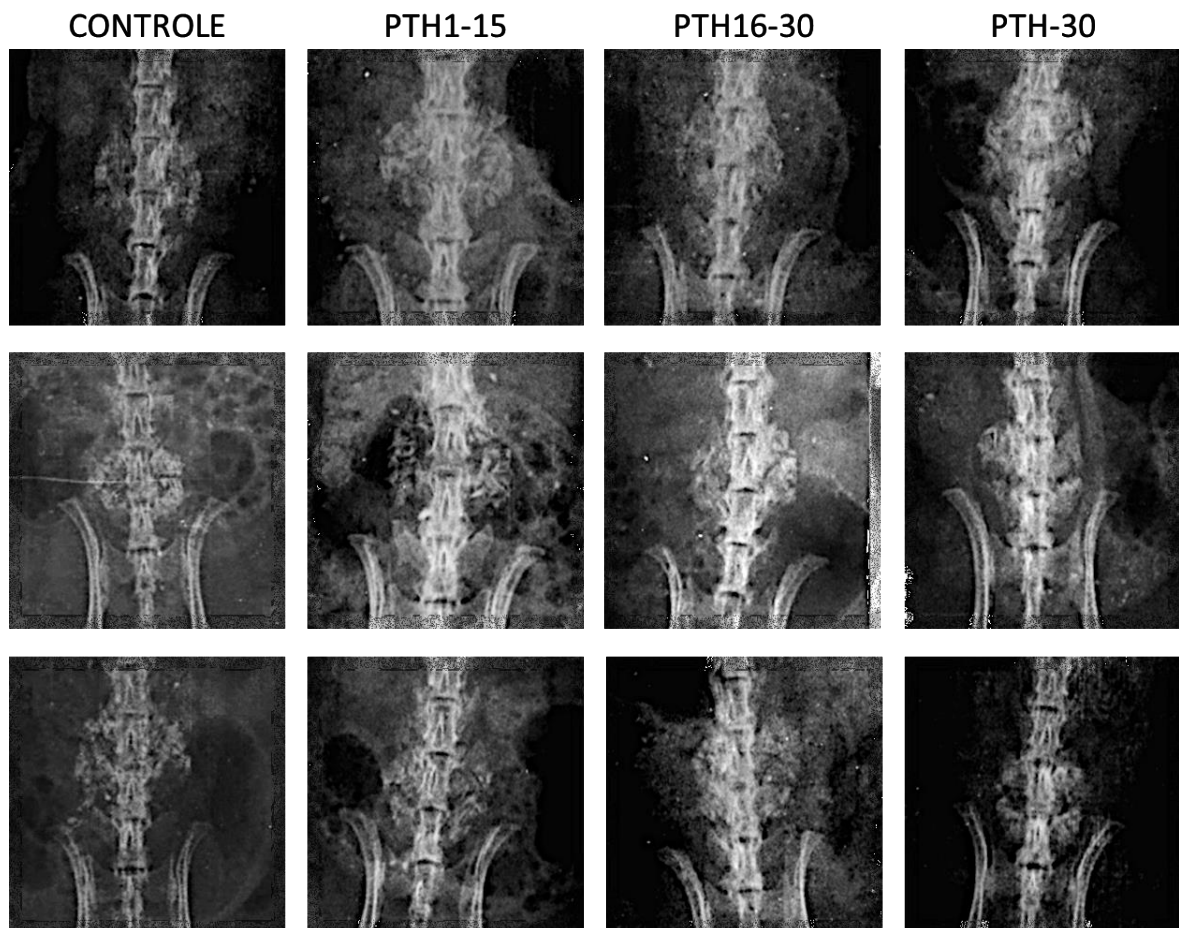


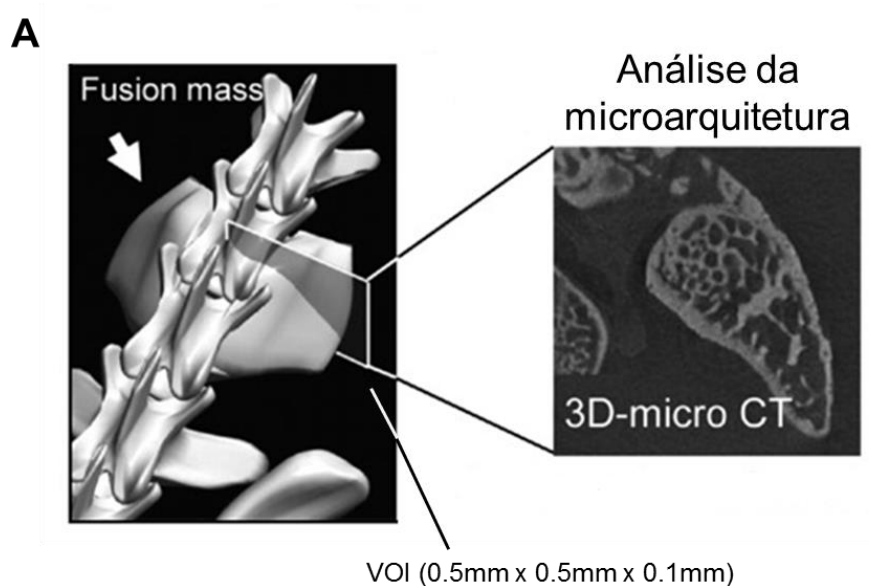
Figura 10 : Aspectos radiológicos da massa de fusão. Imagens representativas dos principais aspectos radiográficos encontrados nos grupos estudados. Foram apresentados 3 animais por grupo. No grupo controle, observa-se um padrão ainda desorganizado, com a maioria dos animais apresentando linha de radiolucência. No grupo PTH 1-15, nota-se o padrão espiculado da massa de fusão, indicando abundância de fragmentos do enxerto que não foram reabsorvidos. Na imagem do grupo PTH 16-30, observa-se o padrão organizado da massa de fusão, com ausência de fragmentos do enxerto. No grupo PTH 30, observa-se a ausência de espículas ósseas na massa de fusão, entretanto, há uma linha de radiolucência de tamanho considerável na porção central de ambos os lados da artrodese na maioria dos animais observados.

Os animais do grupo PTH 16-30 apresentaram ponte óssea bem definida, com poucos fragmentos de enxerto e aspecto compactado e organizado. Em algumas análises, observou-se o padrão de corticalização da massa de fusão, indicando o amadurecimento desta. Todos os animais deste grupo foram classificados como "fusão", apesar de um dos animais ter apresentado uma tênue linha de radiolucência em um dos lados da artrodese **(Figura 10)**.

Por fim, no grupo PTH 30, foi encontrada uma massa de fusão organizada, bastante compacta, com poucas espículas ósseas, entretanto, neste grupo, três animais foram classificados como “não fusão” sendo encontrada uma linha de radiolucência espessa na porção central da massa de fusão, indicando um atraso no processo de ossificação **(Figura 10)**.

5.3 Avaliação da microarquitetura da massa de fusão

Os aspectos microestruturais da massa de fusão, nas diferentes condições, foram avaliados por microtomografia **(Figura 11)**. Através desta análise, podemos observar que houve um aumento na qualidade óssea nos grupos tratados com PTH, ainda que os resultados não tenham apresentado significância estatística. Os parâmetros espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th) e fração de volume ósseo (BV/TV) foram superiores no grupo PTH 30. A avaliação da separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp) e do número de trabéculas óssea (Tb.N) da massa de fusão, demonstraram que a terapia com PTH produziu uma massa óssea com maior número de trabéculas e com trabéculas mais próximas umas as outras. Esse efeito foi mais evidente no grupo PTH 30 e de forma mais discreta nos grupos PTH 16-30 e PTH 1-15 **(Figura 11)**.



B

	Controle	PTH 1-15	PTH 16-30	PTH 30	P
BV/TV (%)	36,03 ± 11,39	34,79 ± 7,77	40,40 ± 10,11	48,88 ± 7,87	0,643
Tb.Th (µm)	71,24 ± 13,74	71,74 ± 3,57	71,49 ± 6,057	78,35 ± 5,268	0,838
Tb.N (1/mm)	4,2 ± 1,27	4,704 ± 0,904	5,260 ± 0,934	6,027 ± 0,665	0,543
Tb.Sp (µm)	94,5 ± 6,14	88,0 ± 5,162	83,38 ± 7,21	80,64 ± 4,55	0,4

Figura 11: Avaliação dos aspectos qualitativos da massa de fusão. (A) representação da área da massa de fusão na qual a análise dos aspectos microestruturais foram analisados (adaptado de Abe et al., 2007). Após a eutanásia, os fragmentos lombares foram analisados por microtomografia computadorizada. Em (B) estão descritos as médias ± DP para cada parâmetro avaliado no diferentes grupos.

Realizamos também uma análise tridimensional de toda a massa de fusão formada, onde observamos um aumento do volume ósseo (BV) ($p=0,0006$) e fração de volume ósseo (BV/TV) ($p=0,0002$) no grupo PTH 30 em relação aos demais grupos. A avaliação da superfície óssea específica (BS/BV) evidenciou que tanto o grupo PTH 30, quanto o grupo PTH 16-30 produziram um regenerado mais compacto que os demais grupos ($p=0,0015$). Esses achados corroboram os encontrados na radiografia simples e indicam um padrão de maturidade da massa de fusão nesses grupos (**Figura 12**).

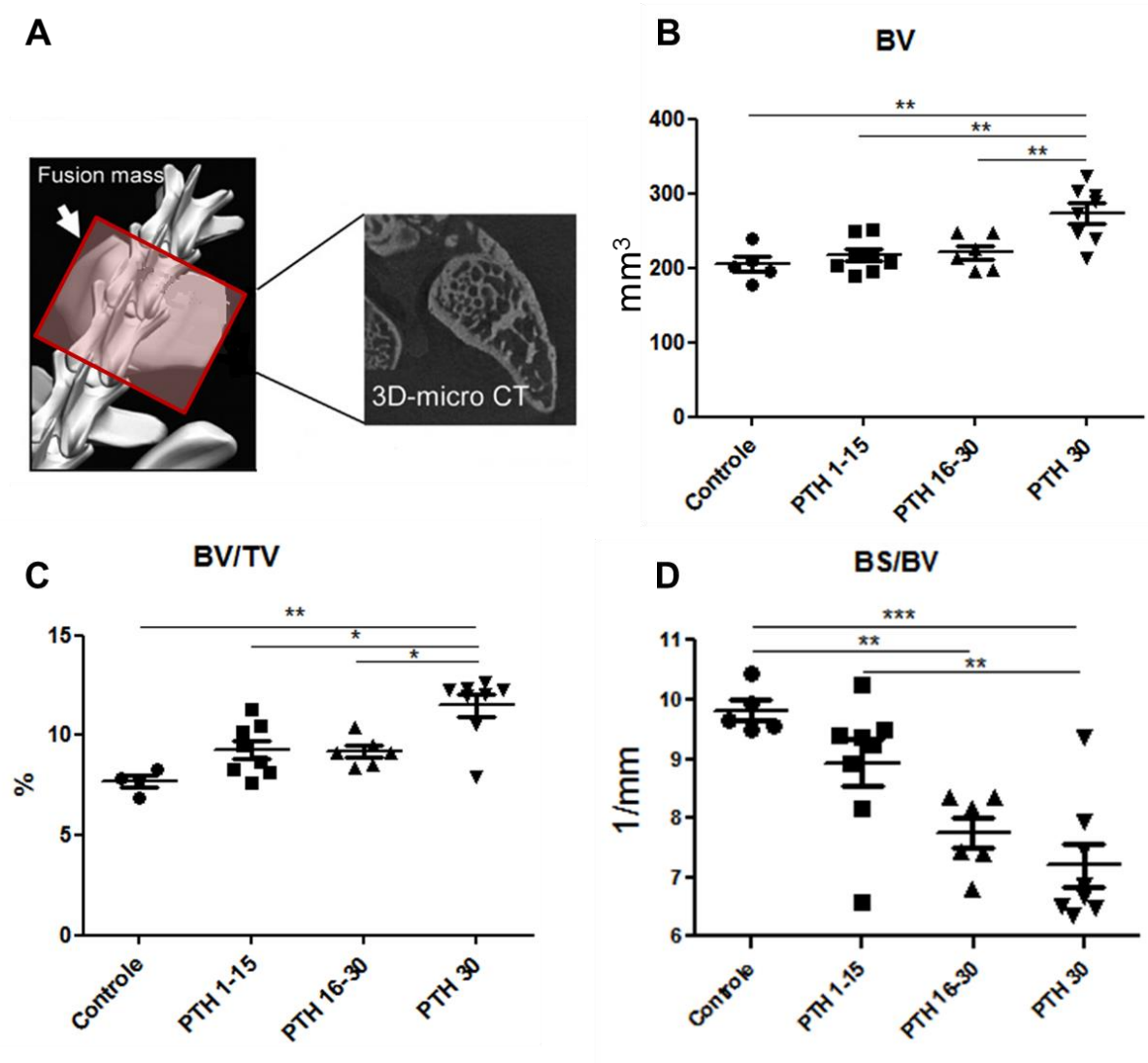


Figura 12: Avaliação tridimensional da massa de fusão por microtomografia. (A) representação do volume de interesse (VOI) analisado por microtomografia. Após a eutanásia, os fragmentos lombares foram analisados por microtomografia computadorizada, onde foi delineado um VOI para cada amostra, contendo a massa de fusão e as vértebras envolvidas no procedimento de fusão (adaptado de Abe et al., 2007). (B) Os valores de volume ósseo (BV), (C) fração de volume ósseo (BV/TV) e (D) superfície óssea específica (BS/BV) dos animais de cada grupos estão apresentados.

6. DISCUSSÃO

Com o aumento mundial da expectativa de vida, houve um aumento na indicação de procedimentos ortopédicos para pacientes da terceira idade, população na qual a osteoporose é altamente prevalente (BOSCHITSCH et al., 2017). Dessa forma, a busca por intervenções que venham a otimizar o processo de formação óssea nesta população são extremamente necessárias. O uso de fármacos osteoanabólicos, como a teriparatida, é uma realidade cada vez mais comum. Além das indicações mais formais, como seu uso em osteoporose grave, especialmente nos casos de refratariedade ou intolerância a terapia anti-reabsortiva, muitos estudos, tanto em modelos animais, quanto em pacientes, apontam outras situações onde esta terapia é bem sucedida, como no reparo de fraturas e fusão óssea (SKRIPITZ, 2000; ASPENBERG et al., 2010; CAPRIANI et al., 2012; TAKAHATA et al., 2012; CAMPBELL et al., 2015; HAAS e LEBOFF, 2018).

Ainda que muitos trabalhos suportem o uso clínico do PTH no pós-operatório da artrodese de coluna, essa terapia ainda tem baixa adesão. A aplicação diária por via subcutânea, a ocorrência de efeitos colaterais, como a hipotensão ortostática e a hipocalcemia, além do elevado custo desta medicação, são fatores que limitam uma maior utilização dessa terapia (CAPRIANI et al., 2012; HAAS e LEBOFF, 2018). Além disso, muitas questões em relação ao seu uso no contexto das cirurgias de artrodese vertebral permanecem em aberto, dentre elas a dose, a duração do tratamento e o momento ideal para início do tratamento (TAKAHATA et al., 2012). O tratamento com PTH modula o processo de formação da massa de fusão, através de sua ação em diferentes células, em diferentes etapas do processo. Diante deste cenário, nosso estudo utilizou um modelo pré-clínico para avaliar o melhor momento para início deste tratamento e a aplicabilidade de terapias de curto prazo, visando otimizar o

processo de formação da massa de fusão após o procedimento de artrodese vertebral no contexto da osteoporose.

O modelo murino de osteoporose induzida por ooforectomia vem sendo amplamente utilizado, por ser um modelo reprodutível e por refletir diversas alterações fisiológicas observadas em mulheres osteoporóticas (LELOVAS et al., 2008; SOPHOCLEOUS e IDRIS, 2014; BONUCCI e BALLANTI, 2014). Neste modelo, as alterações no metabolismo ósseo, características da osteoporose, podem ser acessadas através da análise da arquitetura óssea, ou por avaliação de marcadores séricos desta doença (YOON et al., 2012). No nosso trabalho, para caracterização da osteoporose induzida por ooforectomia, optamos por medir os níveis séricos do marcador de reabsorção óssea CTX-I. Apesar deste marcador não ser comumente utilizado para diagnóstico da osteoporose na prática clínica, ele pode ser utilizado para prever o risco de fraturas e monitorar a resposta às terapias anti-reabsortivas (CARVALHO et al., 2016). Em modelos animais, a mensuração de CTX-I é considerada o padrão ouro para caracterização da osteoporose (YOON et al., 2012). Nossos dados indicam que seis semanas após a cirurgia de castração, há estabelecimento do estado osteoporótico, uma vez que há aumento dos níveis deste marcador nas ratas submetidas á ooforectomia em relação às ratas não castradas.

Diversas publicações, em modelos animais e estudos clínicos, confirmam os benefícios do uso da terapia com teriparatida iniciada imediatamente após a cirurgia de fusão (LOUGHLIN et al., 2009; MING et al., 2012; OHTORI et al., 2012; SCHMIDT et al., 2018). De acordo com a sequência de eventos biológicos envolvidos no processo de formação de uma artrodese posterolateral, descrita por Boden (1998), nas fases iniciais, predominam eventos catabólicos, tanto para "limpeza" do sítio cirúrgico, quanto para reabsorção do enxerto. Nas fases intermediárias, ocorrem os processos de ossificação, enquanto na fase tardia, observamos o remodelamento da massa de osso novo (BODEN, 1998). O estudo de

Abe e colaboradores (2007), realizado em ratas osteoporóticas, corroborou tais achados, ao avaliar, através da análise de expressão gênica, eventos que estão envolvidos nas etapas iniciais do processo de fusão. Foi observado que a expressão de proteínas envolvidas na ativação e função de osteoclastos, como a fosfatase ácida resistente ao tartrato e RANKL, começava a aumentar entre 4 e 7 dias após a cirurgia de fusão, ao passo que a expressão de proteínas envolvidas na ativação e função de osteoblastos, como fosfatase alcalina e osteocalcina, aumentavam apenas a partir do 14º dia (ABE et al., 2007). Tais estudos foram fundamentais para o delineamento do desenho experimental do presente trabalho. Uma vez que o efeito osteoanabólico da teriparatida reside, principalmente, na sua atuação sobre o número e função de osteoblastos, optamos por avaliar dois momentos distintos para o início do tratamento: 1) estímulo precoce, fornecido nas fases iniciais, durante a fase "catabólica", representado pelo grupo PTH 1-15; e 2) estímulo tardio, iniciado na fase intermediária (fase de ossificação), representado pelo grupo PTH 16-30. Os grupos controle e PTH 30 foram incluídos como controle negativo e positivo, respectivamente.

Vários estudos em modelo de artrodese vertebral em ratos mostram que 4 semanas após a cirurgia, já começa a ser observada a formação da massa de fusão, sendo o processo finalizado em 8 semanas (ISHIDA et al., 2016; PARK et al., 2017). Optamos por realizar a eutanásia dos animais cinco semanas após a cirurgia de artrodese, com o objetivo de avaliar a massa de artrodese ainda em formação, objetivando identificar as maiores diferenças entre os grupos.

O primeiro ensaio que utilizamos para avaliar a massa de artrodese foi a avaliação manual da fusão, que é o teste ouro para confirmar a fusão óssea em modelos pré-clínicos (ISHIDA et al., 2016). Em nosso estudo, o único grupo que apresentou 100% de fusão, através desta análise, foi o grupo PTH 16-30. A taxa de fusão dos grupos PTH1-15 e PTH 30 foi menor que a observada no grupo controle. A comparação entre a taxa de fusão encontrada

neste estudo e em outros relatos da literatura deve levar em consideração o tempo de avaliação e a dose utilizada. Nossos resultados são compatíveis ao estudo de Qiu e colaboradores (2013), que utilizou o mesmo modelo animal e dose de teriparatida, obtendo taxa de fusão de 60% no grupo controle e de cerca de 90% no grupo que usou a teriparatida por 6 semanas (QIU et al., 2013). Outro estudo, de Abe e colaboradores (2007), encontrou taxa de fusão de 86% no grupo controle e 100% no grupo tratado diariamente com PTH, sendo a avaliação realizada 4 semanas após a cirurgia de fusão. Tal diferença pode ser explicada pela dose de teriparatida utilizada, que foi de 30 µg/kg em nosso estudo vs 40µg/kg, no estudo em questão, sendo bem estabelecido que o efeito da teriparatida é dose dependente (ABE et al., 2007; MING et al., 2012).

Apesar da subjetividade da avaliação manual da fusão, cabe salientar que em nosso estudo, tal análise foi realizada por pelo menos 5 avaliadores, sendo 2 cirurgiões especialistas em coluna vertebral e pelo menos 2 pesquisadores com experiência em modelos animais. Havendo sempre concordância entre os avaliadores para confirmação ou exclusão da fusão vertebral.

Os resultados da avaliação radiográfica foram similares aos observados na avaliação manual. Esta avaliação permite uma análise de características gerais da massa de fusão, ainda que uma limitação encontrada tenha sido o fato de que o aparelho utilizado neste estudo não permitir a obtenção de imagens com alta resolução. A partir desta avaliação, pudemos observar que a massa de fusão dos animais tratados com PTH por 30 dias (PTH 30) era maior que a dos outros grupos. Além disso, foi possível analisar detalhadamente a massa de fusão de cada animal e correlacionar com os resultados do teste de palpação manual. Logo, verificamos que os animais do grupo controle e do grupo PTH 1-15 apresentaram grande quantidade de fragmentos de enxerto na região da massa de fusão, sugerindo que o enxerto não foi completamente absorvido. O resultado observado no grupo controle corrobora os

resultados de Abe e colaboradores (2007) que descreveram que, 28 dias após a cirurgia de fusão, fragmentos de enxerto ainda eram observados na massa de fusão de ratos não osteoporóticos que não receberam nenhum tipo de tratamento (ABE et al., 2007).

Caruso e colaboradores (1991), demonstraram que o PTH tem efeito supressor em processos inflamatórios deflagrados por diferentes estímulos (CARUSO et al., 1991). Uma vez que o processo de consolidação se inicia com uma fase inflamatória, acreditamos que o tratamento precoce leva a uma supressão desta resposta inflamatória, prejudicando as etapas subsequentes do processo de formação da massa de fusão e levando a redução da taxa de fusão, como observado no grupo PTH 1-15.

Outro aspecto importante observado através desta análise, foi o grande número de animais do grupo PTH 30 com linhas de radiolucência na porção central da massa de fusão. Uma análise mais detalhada deste material é uma perspectiva deste estudo, uma vez que esta linha de radiolucência tanto pode ser formada por tecido cartilaginoso, ainda não ossificado, indicando que o processo formação de osso novo ainda está acontecendo, quanto pode ser formada por tecido fibroso, significando um processo de pseudoartrose, indicando falha no processo de fusão (REID et al., 2011). Como nossa análise foi realizada apenas cinco semanas após a cirurgia, tempo insuficiente para a finalização do processo de formação da massa de fusão, acreditamos que estas linhas radiolucientes reflitam a presença de tecido cartilaginoso indicando que uma fusão estável ainda irá acontecer. Além disso, como o processo de ossificação se inicia próximo aos processos transversos e, com o passar do tempo, migra para a porção central da massa de fusão, a localização destas linhas de radiolucência, também indicam que o processo ainda este em formação (BODEN et al., 2002).

O estudo de O'Loughlin e colaboradores (2009), utilizando coelhos submetidos ao procedimento de artrodese vertebral, observou que, seis semanas após a cirurgia, os animais tratados com PTH apresentavam maior taxa de fusão e a massa de fusão formada era maior

que a observada nos animais controle (O'LOUGHLIN et al., 2009). A análise histológica da massa de fusão destes animais revelou que o percentual de cartilagem na massa de fusão dos animais que foram tratados com PTH era significativamente maior que a dos animais controle ($26,6 \pm 2,7 \%$ vs $2,7 \pm 3,5 \%$, respectivamente). Takahata e colaboradores (2013), ao estudarem o efeito do tratamento precoce com PTH na consolidação óssea em defeitos de tamanho crítico, através da análise da expressão gênica, evidenciou aumento na expressão de genes relacionados à condrogênese, associando tal fato a um prejuízo no processo de ossificação endocondral (TAKAHATA et al., 2012). Além disso, diversos estudos já demonstraram que o tratamento com PTH nas fases iniciais do processo de consolidação de fraturas estimula a condrogênese, levando a formação de calos ósseos maiores devido ao aumento na quantidade de tecido cartilaginoso (NAKAZAWA et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2006).

Por fim, avaliamos a massa de fusão por microtomografia computadorizada. Foram realizadas duas estratégias de análise: 1) análise da microarquitetura, onde, a partir da delimitação de uma região de interesse de tamanho constante para todos os grupos, foram mensurados aspectos relacionados à qualidade óssea da massa de fusão e 2) avaliação tridimensional da massa de fusão, onde foram mensurados aspectos macroestruturais da massa de fusão, sendo o tamanho da região de interesse ajustado ao tamanho do conjunto vértebra + massa de fusão avaliada (YASEN et al., 2015). A partir da análise da microarquitetura da massa de fusão, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos, ainda que haja uma tendência de melhora destes parâmetros no grupo PTH 30 em relação ao grupo controle. Diversos fatores podem ter contribuído para não termos encontrado diferenças estatísticas nestas análises. O primeiro deles é o fato de termos realizado a análise apenas cinco semanas após a cirurgia de artrodese, sendo que na maioria dos estudos, esta análise é feita entre 6 e 8 semanas após a cirurgia e início do tratamento com PTH. Além

disso, nosso estudo perde poder estatístico uma vez que o desenho experimental é desbalanceado, ou seja, com número diferente de animais por grupo. Portanto, temos dois cenários possíveis: 1) os grupos de fato não são diferentes entre si, o que pode indicar que a microarquitetura da massa de fusão não é alterada pelo tratamento com PTH e 2) os grupos apresentam diferenças sutis na microarquitetura da massa de fusão, sendo tal efeito melhor evidenciado, se tivéssemos um maior número de animais por grupo, ou uma análise temporal da amostra.

A análise tridimensional da massa de fusão, por outro lado, revelou importantes diferenças entre os grupos. Em relação ao volume ósseo, observamos que, de fato, a massa de fusão dos animais do grupo PTH 30 era maior que a dos animais dos outros grupos, corroborando os resultados da avaliação radiográfica. O mesmo padrão foi observado em relação a fração de volume ósseo. Apesar do maior tamanho da massa de fusão, não observamos aumento na taxa de fusão no grupo PTH 30. Achado semelhante já foi descrito por Takahata e colaboradores (2013), que estudaram o efeito do PTH no processo de consolidação de defeitos ósseos de tamanho crítico, associado ao uso de aloenxertos desvitalizados. De acordo com este estudo, ainda que o calo ósseo dos animais tratados com PTH fosse mais exuberante, as taxas de consolidação não eram relacionadas ao tamanho do calo formado (TAKAHATA et al., 2012).

De forma interessante, entretanto, ao analisarmos a superfície óssea específica, observamos que não havia diferença neste parâmetro entre os grupos PTH 30 e PTH 16-30 e que estes grupos apresentaram menor superfície óssea que os outros grupos. A superfície óssea específica mede a relação entre a superfície da amostra e seu volume, refletindo, em última instância, o grau de compactação da amostra. Consequentemente, quanto menor o valor deste parâmetro, mais compactada estará a amostra. Park e colaboradores, ao estudarem o processo de formação de massa de fusão em ratos normais e osteopênicos, encontrou que a

principal diferença entre estes grupos residia justamente na superfície óssea específica. Estes pesquisadores mostraram que os valores de BS/BV reduziam significativamente nos animais controle a partir da quarta semana pós-cirurgia, enquanto se mantinha constantemente elevada nos animais osteopênicos. Este autor correlacionou a superfície óssea específica a maior maturação da amostra, indicando que o processo de remodelamento ósseo da massa estava em andamento (PARK et al., 2017). Com base nestes achados, podemos propor que tanto o tratamento tardio (PTH16-30), quanto o tratamento realizado durante todo o período pós-operatório (PTH 30) levam a formação de massas de fusão mais maduras em menor tempo.

De forma geral, nossos achados indicam que a terapia de curto prazo com PTH, iniciada imediatamente após a cirurgia leva a um atraso no processo de formação da massa de fusão, provavelmente por inibir a fase inflamatória. Dessa forma, além da baixa taxa de fusão, este grupo apresenta também massa de fusão com grande quantidade de fragmentos de enxerto, apresentando baixo grau de maturação, revelado pela alta superfície óssea específica encontrada. Já a terapia de curto prazo iniciada mais tardiamente, leva a formação de massa de fusão de tamanho moderado, altas taxas de fusão e alto grau de compactação, indicando uma massa de fusão sólida e madura. Por outro lado, o tratamento com PTH iniciado imediatamente após a cirurgia e mantido até a quarta semana, ainda que leve a formação de massas de fusão exuberantes, apresenta menor taxa de fusão e linhas da radiolucência, indicando uma exacerbação na condrogênese induzida pelo tratamento com este medicamento.

Nosso estudo extrapola os achados de Takahata (2012), evidenciando que na fusão vertebral, assim como na consolidação de fraturas de tamanho crítico, o tratamento com PTH iniciado mais tardiamente, aumenta a taxa de fusão, levando a formação de massas ósseas de tamanho modesto porém mais maduras (TAKAHATA et al., 2012).

Uma importante limitação deste estudo foi a ausência de ensaios biomecânicos, análise temporal e avaliação histológica, que representariam um grande ganho conceitual, permitindo explorar os mecanismos envolvidos nos fenômenos observados. Por fim, ressaltamos a necessidade de estudos clínicos, para avaliação da segurança e eficácia da terapia de curto prazo com PTH iniciada nas fases intermediárias e tardias da consolidação de cirurgias de fusão vertebral e que venham a validar os resultados relatados por este estudo, em seres humanos.

7. CONCLUSÃO

Diante dos dados descritos nesse estudo, verificamos que a terapia de curto prazo com teriparatida, iniciada precocemente após a cirurgia de fusão vertebral, é dispensável, uma vez que não resulta em melhorias no processo de formação da massa de fusão. Por outro lado, as terapias iniciadas mais tardiamente apresentam benefícios tanto em relação a formação de uma massa mais estável em menos tempo, quanto em relação a menores custos e menor exposição ao medicamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; TAKAHATA, M.; ITO, M.; IRIE, K.; ABUMI, K.; MINAMI, A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model. **Bone**, v. 41, n. 5, p. 775–785, 2007.

ASPENBERG, P.; GENANT, H. K.; JOHANSSON, T.; NINO, A. J.; SEE, K.; KROHN, K.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, P. A.; RECKNOR, C. P.; EINHORN, T. A.; DALSKY, G. P.; MITLAK, B. H.; FIERLINGER, A.; LAKSHMANAN, M. C. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: A prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 2, p. 404–414, 2010.

BACCARO, L. F.; CONDE, D. M.; COSTA-PAIVA, L.; PINTO-NETO, A. M. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: A viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583–591, 2015.

BLUMSOHN, A.; MARIN, F.; NICKELSEN, T.; BRIXEN, K.; SIGURDSSON, G.; DE LA VERA, J. G.; BOONEN, S.; LIU-L?AGE, S.; BARKER, C.; EASTELL, R. Early changes in biochemical markers of bone turnover and their relationship with bone mineral density changes after 24 months of treatment with teriparatide. In: Osteoporosis International, 6, **Anais**.2011.

BODEN, S. D. The biology of posterolateral lumbar spinal fusion. **The Orthopedic clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 603–19, 1998.

BODEN, S. D. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. **Spine**, v. 27, n. 16 Suppl 1, p. S26-31, 2002.

BOGUSZEWSKI, L. C.; BRONSTEIN, M. D.; CZEPIELEWSKI, M.; RAQUEL, S.; NETO, L. V.; ABUCHAM, J.; ARAUJO, L. A. de; BOGUSZEWSKI, L. C.; JALLAD, R. S.; NAVES, L. A.; RIBEIRO-OLIVEIRA JÚNIOR, A.; FARIA, M. dos S.; GADELHA, M. R. Recomendações do Departamento de Neuroendocrinologia da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia para o diagnóstico e tratamento da acromegalia no Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 2, p. 91–105, 2011.

BONUCCI, E.; BALLANTI, P. Osteoporosis—Bone Remodeling and Animal Models. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 6, p. 957–969, 2014.

BOSCHITSCH, E. P.; DURCHSCHLAG, E.; DIMAI, H. P. Age-related prevalence of osteoporosis and fragility fractures: real-world data from an Austrian Menopause and Osteoporosis Clinic. **Climateric**, v. 20, n. 2, p. 157–163, 2017.

BOSKEY, A. L.; IMBERT, L. Bone quality changes associated with aging and disease: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1410, n. 1, p. 93–106, 2017.

BOUILLON, R.; DRUCKER, D. J.; FERRANNINI, E.; GRINSPOON, S.; ROSEN, C. J.;

ZIMMET, P. The past 10 years-new hormones, new functions, new endocrine organs. **Nature Reviews Endocrinology**, 2015.

BRODSKY, A.; KOVALSKY, E.; KHALIL, M. **Correlation of radiologic assessment of lumbar spine fusion with surgical exploration** Spine (Phila Pa 1976). Jun;16(6 Suppl):S261-5., 1991.

CAMPBELL, E. J.; CAMPBELL, G. M.; HANLEY, D. A.; CANADA, A. The effect of parathyroid hormone and teriparatide on fracture healing. p. 1–11, 2015.

CAPRIANI, C.; IRANI, D.; BILEZIKIAN, J. P. Safety of osteoanabolic therapy: A decade of experience. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 12, p. 2419–2428, 2012.

CARUSO, A.; AMICO-ROXAS, M.; CUTULI, V.; PRATO, A.; FIORE, C. E.; CLEMENTI, G. Parathyroid hormone fragment 11-34 inhibits drug-induced inflammation in various experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v. 198, n. 1962, p. 85–88, 1991.

CARVALHO, C. J. De; LIMA, L. M.; LIMA, L. M. Desintometria óssea, CTX, nível de atividade física e força na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, v. 22, n. 3, p. 206–210, 2016.

CHAKRABORTY, C.; SHINOHARA, Y.; SESSA, G.; PAVONE, V.; TESTA, G.; GIARDINA, S. M. C.; VESCIO, A.; RESTIVO, D. A. Pharmacological Therapy of Osteoporosis: A Systematic Current Review of Literature. 2017a.

CHAKRABORTY, C.; SHINOHARA, Y.; SESSA, G.; PAVONEPHARMACOLOGICAL THERAPY OF OSTEOPOROSIS: A SYSTEMATIC CURRENT REVIEW OF LITERATURE, V.; TESTA, G.; GIARDINA, S. M. C.; VESCIO, A.; RESTIVO, D. A. Pharmacological Therapy of Osteoporosis: A Systematic Current Review of Literature. 2017b.

CHAUDHARY, N.; LEE, J. S.; WU, J. Y.; THARIN, S. Evidence for Use of Teriparatide in Spinal Fusion Surgery in Osteoporotic Patients. **World Neurosurgery**. 2017.

CHIN, D. K.; PARK, J. Y.; YOON, Y. S.; KUH, S. U.; JIN, B. H.; KIM, K. S.; CHO, Y. E. Prevalence of osteoporosis in patients requiring spine surgery: incidence and significance of osteoporosis in spine disease. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 9, p. 1219–1224, 21 ago. 2007.

CLOYD, J. M.; ACOSTA, F. L.; AMES, C. P. Complications and outcomes of lumbar spine surgery in elderly people: A review of the literature. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 56, n. 7, p. 1318–1327, 2008.

CONTI, O.; DEFINO, H. A. ESTUDO EXPERIMENTAL DA DECORTICAÇÃO ÓSSEA NA EXPERIMENTAL AÇÃO DOS ENXERTOS NA COL. **ACTA ORTOP BRASILEIRA**, v. 14, n. 2, p. 67–71, 2006.

CULLER, S. D.; MCGUIRE, K. J. The Incremental Hospital Cost and Length-of-Stay Associated with Treating Adverse Events Among Medicare Beneficiaries Undergoing Cervical Spinal Fusion during Fiscal Year 2013 and 2014. **Spine** 2017.

CZYŻ, M.; KAPINAS, A.; HOLTON, J.; PYŻIK, R.; BOSZCZYK, B. M.; QURAISHI, N. A. The computed tomography-based fractal analysis of trabecular bone structure may help in detecting decreased quality of bone before urgent spinal procedures. **Spine Journal**, v. 17, n. 8, p. 1156–1162, 2017.

DEYO, R. A.; GRAY, D. T.; KREUTER, W.; MIRZA, S.; MARTIN, B. I. United States trends in lumbar fusion surgery for degenerative conditions. **Spine**, v. 30, n. 12, p. 1441–1445, 2005.

DRESPE, I. H.; POLZHOFFER, G. K.; TURNER, A. S.; GRAUER, J. N. Animal models for spinal fusion. **Spine J**, v. 5, n. 6 Suppl, p. 209S–216S, 2005.

GALI, J. C. Osteoporose. **Acta Ortop Bras**, v. 9, n. 2, p. 3–12, 2001.

GLASSMAN, S. D.; POLLY, D. W.; BONO, C. M.; BURKUS, K.; DIMAR, J. R. Outcome of Lumbar Arthrodesis in Patients. **J Bone Joint Surg Am**, v. 92 Suppl 1, n. 4, p. 783–790, 2009.

HARPER, K. D. Osteosarcoma and teriparatide? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 2, p. 334, 2007.

HERNLUND, E.; SVEDBOM, A.; IVERGÅRD, M.; COMPSTON, J.; COOPER, C.; STENMARK, J.; MCCLOSKEY, E. V.; JÖNSSON, B.; KANIS, J. A. Osteoporosis in the European Union: Medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). **Archives of Osteoporosis**, v. 8, n. 1–2, 2013.

ISHIDA, W.; ELDER, B. D.; HOLMES, C.; LO, S. F. L.; WITHAM, T. F. Variables Affecting Fusion Rates in the Rat Posterolateral Spinal Fusion Model with Autogenic/Allogenic Bone Grafts: A Meta-analysis. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 44, n. 11, p. 3186–3201, 2016.

KALIYA-PERUMAL, A.-K.; LU, M.; LUO, C.; TSAI, T.; LAI, P.; CHEN, L.-H.; CHEN, W.; NIU, C. Retrospective radiological outcome analysis following teriparatide use in elderly patients undergoing multilevel instrumented lumbar fusion surgery. 2017.

KAMMERLANDER, C.; NEUERBURG, C.; VERLAAN, J.-J.; SCHMOELZ, W.; MICLAU, T.; LARSSON, S. The use of augmentation techniques in osteoporotic fracture fixation. **Injury**, v. 47, p. S36–S43, 2016.

KLEEREKOPER, M.; GREENSPAN, S. L.; LEWIECKI, E. M.; MILLER, P. D.; KENDLER, D. L.; MARICIC, M.; KEAVENY, T. M.; KOPPERDAHL, D. L.; RUFF, V. A.; WAN, X.; JANOS, B.; KROHN, K. Assessing the Effects of Teriparatide Treatment on Bone Mineral Density, Bone Microarchitecture, and Bone Strength. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**, v. 96, n. 11, p. e90–1–9, 2014.

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

KULAR, J.; TICKNER, J.; CHIM, S. M.; XU, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 863–873, 2012.

KYUN NA, M.; DEOK WON, Y.; KIM, C. H.; KIM, J. M.; CHEONG, J. H.; RYU, J. I.; HAN, M.-H. Opportunistic osteoporosis screening via the measurement of frontal skull Hounsfield units derived from brain computed tomography images. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–13, 2018.

LASOTA, a; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental osteoporosis--different methods of ovariectomy in female white rats. **Annales Academiae Medicae Bialostocensis**, v. 49 Suppl 1, p. 129–131, 2004.

LAWRENCE, J. P.; ENNIS, F.; WHITE, A. P.; MAGIT, D.; POLZHOFFER, G.; DRESPE, I.; TROIANO, N. W.; GRAUER, J. N. Effect of daily parathyroid hormone (1-34) on lumbar fusion in a rat model. **Spine Journal**, v. 6, n. 4, p. 385–390, 2006.

LEE, M.; PARTRIDGE, N. C. Parathyroid hormone signaling in bone and kidney *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2009.

LELOVAS, P. P.; XANTHOS, T. T.; THORMA, S. E.; LYRITIS, G. P.; DONTAS, I. A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 5, p. 424–430, 2008.

LEVEN, D.; CHO, S. K. Pseudarthrosis of the cervical spine: Risk factors, diagnosis and management. **Asian Spine Journal**, v. 10, n. 4, p. 776–786, 2016.

LIU, Y.; LEVACK, A. E.; MARTY, E.; OR, O.; SAMUELS, B. P.; REDKO, M.; LANE, J. M. Anabolic agents: what is beyond osteoporosis? **Osteoporosis International**, v. 29, n. 5, p. 1009–1022, 2018.

MARTIN, B. I.; MIRZA, S. K.; COMSTOCK, B. A.; GRAY, D. T.; KREUTER, W.; DEYO, R. A. Reoperation rates following lumbar spine surgery and the influence of spinal fusion procedures. **Spine**, v. 32, n. 3, p. 382–387, 2007.

MING, N.; CHENG, J. T. Y.; RUI, Y. F.; CHAN, K. M.; KUHSTOSS, S.; MA, Y. L.; SATO, M.; WANG, Y.; LI, G. Dose-dependent enhancement of spinal fusion in rats with teriparatide (PTH[1-34]). **Spine**, v. 37, n. 15, p. 1275–1282, jul. 2012.

MORAES, L. F. S.; SILVA, E. N. da; SILVA, D. A. S.; PAULA, A. P. de. Expenditures on the treatment of osteoporosis in the elderly in Brazil (2008 - 2010): analysis of associated factors. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 3, p. 719–734, 2014.

MORIMOTO, T.; KAITO, T.; MATSUO, Y.; SUGIURA, T.; KASHII, M.; MAKINO, T.; IWASAKI, M.; YOSHIKAWA, H. The bone morphogenetic protein-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration than the individual homodimers in a rat spinal fusion model. **Spine Journal**, v. 15, n. 6, p. 1379–1390, 2015.

MORONE, M. .; BODEN, S. D.; HAIR.GREGORY. Gene Expression during autograft lumbar spine fusion and the effect of bone morphogenetic protein 2. **Clinic orthopaedics and related research**, v. 351, n. june, p. :252-65., 1998.

MORRIS, M. T.; TARPADA, S. P.; CHO, W. Bone graft materials for posterolateral fusion made simple: a systematic review. **European Spine Journal**, n. 0123456789, p. 1–12, 2018.

NAKAZAWA, T.; NAKAJIMA, A.; SHIOMI, K.; MORIYA, H.; EINHORN, T. A.; 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**, v. 37, n. 5, p. 711–719, nov. 2005.

O'LOUGHLIN, P. F.; CUNNINGHAM, M. E.; BUKATA, S. V.; TOMIN, E.; POYNTON, A. R.; DOTY, S. B.; SAMA, A. A.; LANE, J. M. Parathyroid hormone (1-34) augments spinal fusion, fusion mass volume, and fusion mass quality in a rabbit spinal fusion model. **Spine**, v. 34, n. 2, p. 121–130, 2009.

OHTORI, S.; INOUE, G.; ORITA, S.; YAMAUCHI, K.; EGUCHI, Y.; OCHIAI, N.; KISHIDA, S.; KUNIYOSHI, K.; AOKI, Y.; NAKAMURA, J.; ISHIKAWA, T.; MIYAGI, M.; KAMODA, H.; SUZUKI, M.; KUBOTA, G.; SAKUMA, Y.; OIKAWA, Y.; INAGE, K.; SAINOH, T.; TAKASO, M.; OZAWA, T.; TAKAHASHI, K.; TOYONE, T. Teriparatide accelerates lumbar posterolateral fusion in women with postmenopausal osteoporosis: Prospective study. **Spine**, v. 37, n. 23, p. 1464–1468, 2012.

OHTORI, S.; ORITA, S. More than 6 Months of Teriparatide Treatment Was More Effective for Bone Union than Shorter Treatment Following Lumbar Posterolateral Fusion Surgery. **Asian Spine Journal**, v. 9, n. 4, p. 573–580, 2015.

OLIVEIRA, J. H. A. De. Custo da Fratura Osteoporótica de Fêmur no Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro. p. 897–901, 2004.

PARK, S. B.; CHUNG, C. K. Strategies of spinal fusion on osteoporotic spine. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 49, n. 6, p. 317–322, 2011.

PARK, S. B.; KIM, C. H.; HONG, M.; YANG, H. J.; CHUNG, C. K. Effect of a selective estrogen receptor modulator on bone formation in osteoporotic spine fusion using an ovariectomized rat model. **Spine Journal**, v. 16, n. 1, p. 72–81, 2016.

PARK, S. B.; YANG, H.-J.; PH, D.; KIM, C. H.; PH, D.; CHUNG, C. K.; PH, D. Difference in Spinal Fusion Process in Osteopenic and Nonosteopenic Living Rat Models Using Serial Microcomputed Tomography. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 60, n. 3, p. 348–354, 1 maio 2017.

PINHEIRO, M. M.; CICONELLI, R. M. O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 2, p. 113–120, 2010.

PINHEIRO, M. M.; DOS REIS NETO, E. T.; MACHADO, F. S.; OMURA, F.; YANG, J. H. K.; SZEJNFELD, J.; SZEJNFELD, V. L. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. **Revista De Saude Publica**, v. 44, n. 3, p. 479–485, 2010.

PONNUSAMY, K. E.; IYER, S.; GUPTA, G.; KHANNA, A. J. Instrumentation of the

osteoporotic spine: biomechanical and clinical considerations. **The Spine Journal**, v. 11, n. 1, p. 54–63, jan. 2011.

POOLE, K. E. S.; REEVE, J. Parathyroid hormone - A bone anabolic and catabolic agent. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 6 SPEC. ISS., p. 612–617, 2005.

QIN, L.; RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Parathyroid hormone : a double-edged sword for bone metabolism. v. 15, n. 2, 2004.

QIU, Z.; WEI, L.; LIU, J.; SOCHACKI, K. R.; LIU, X.; BISHOP, C.; EBRAHEIM, M.; YANG, H. Effect of intermittent PTH (1-34) on posterolateral spinal fusion with iliac crest bone graft in an ovariectomized rat model. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 10, p. 2693–2700, 2013.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

REEVE, J.; WILLIAMS, D.; HESP, R.; KLENERMAN, L.; DARBY, A. J. **Anabolic effect of low doses of a fragment of human parathyroid hormone on the skeleton in postmenopausal osteoporosis**, 1976..

REID, J. J.; JOHNSON, J. S.; WANG, J. C. Challenges to bone formation in spinal fusion. **Journal of Biomechanics**, v. 44, n. 2, p. 213–220, 2011.

RIGGS, B.; KHOSIA, S.; MELTON, L. Sex steroids and the conservation of the adult skeleton. **Endocrinology Review**, v. 23, n. 3, p. 279–302, 2002.

SCHIMANDLE, J. H.; BODEN, S. D. **Spine update. The use of animal models to study spinal fusion.**Spine, 1994.

SHETTY, S.; KAPOOR, N.; BONDU, J.; THOMAS, N.; PAUL, T. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 846, 2016.

SILVA, T. A. A. Sarcopenia Associada ao envelhecimento: Aspectos etiológicos e opções terapêuticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 6, p. 391–397, 2006.

SKRIPITZ, R. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone: a time sequence study in rats. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 71, n. 6, p. 619–624, 2000.

SKRIPITZ, R.; ASPENBERG, P. Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation. **Clin Orthop Relat Res**, n. 392, p. 427–432, 2001.

SOPHOCLEOUS, A., IDRIS, A. I. Rodent models of osteoporosis. Bonekey Rep. v3: p 614, 2014

SOUZA, B. G. S. e; CARVALHO, L. G. V. A. de; OLIVEIRA, L. F. M. M. de; FERREIRA, A. G.; AMARAL, R. de C. S. do; OLIVEIRA, V. M. de. Primary and secondary osteoporotic fractures prophylaxis: evaluation of a prospective cohort. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 52, n. 5, p. 538–543, 2017.

TABATABAEI-MALAZY, O.; SALARI, P.; KHASHAYAR, P.; LARIJANI, B. New horizons in treatment of osteoporosis. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1–16, 2017.

TAKAHATA, M.; SCHWARZ, E. M.; CHEN, T.; O'KEEFE, R. J.; AWAD, H. A. Delayed Short Course Treatment with Teriparatide (PTH1–34) Improves Femoral Allograft Healing by Enhancing Intramembranous Bone Formation at the Graft-Host Junction. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 1, p. 26–37, 2012.

TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. **Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis** **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** 2014.

TURNER, A. S. Animal models of osteoporosis - Necessity and limitations. **European Cells and Materials**, v. 1, p. 66–81, 2001.

VAHLE, J. L.; LONG, G. G.; SANDUSKY, G.; WESTMORE, M.; MA, Y. L.; SATO, M. Bone Neoplasms in F344 Rats Given Teriparatide [rhPTH(1-34)] Are Dependent on Duration of Treatment and Dose. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 4, p. 426–438, 2004.

VAHLE, J. L.; ZUEHLKE, U.; SCHMIDT, A.; WESTMORE, M.; CHEN, P.; SATO, M. Lack of bone neoplasms and persistence of bone efficacy in cynomolgus macaques after long-term treatment with teriparatide [rhPTH(1-34)]. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 12, p. 2033–2039, 2008.

WENG, S.-J.; YAN, D.-Y.; CHEN, L.; XIE, Z.-J.; WU, Z.-Y.; TANG, J.-H.; SHEN, Z.-J.; LI, H.; BAI, B.-L.; BOODHUN, V.; YANG, L. Combined treatment with vitamin K2 and PTH enhanced bone formation in ovariectomized rats and increased differentiation of osteoblast in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, 2019.

WHO. Geneve world healthy organization, , 1994. .

YASEN, M.; LI, X.; JIANG, L.; YUAN, W.; CHE, W.; DONG, J. Effect of Zoledronic Acid on Spinal Fusion Outcomes in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Research**, p. 1297–1304, 2015.

YISHAKE, M.; YASEN, M.; JIANG, L.; LIU, W.; XING, R.; CHEN, Q.; LIN, H.; DONG, J. Effects of combined teriparatide and zoledronic acid on posterior lumbar vertebral fusion in an aged ovariectomized rat model of osteopenia. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 3, p. 937–944, 2018.

YOKOYAMA, K.; UCHINO, M.; NAKAMURA, K. Risk factors for deep infection in secondary intramedullary nailing after external fixation for open tibial fractures. **Injury**, v. 37, p. 554–560, 2006.

YOON, K. H.; CHO, D. C.; YU, S. H.; KIM, K. T.; JEON, Y.; SUNG, J. K. The change of bone metabolism in ovariectomized rats: Analyses of MicroCT scan and biochemical markers of bone turnover. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 51, n. 6, p. 323–327, 2012.

ANEXO A. Licença da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/INTO)



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

COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA DO INTO

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto “Avaliação do efeito do regime de tratamento com Teriparatida sobre a fusão óssea em ratas osteoporóticas” protocolado sob o número 007/2018, utilizando 32 (trinta e dois) ratos Sprague Dawley, sob a responsabilidade do pesquisador Gustavo Peçanha, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e foi aprovado na reunião da Comissão em 24 de janeiro de 2018.

(We certify that the research “Effect of the treatment onset with Teriparatide on bone fusion in osteoporotic rats”, protocol number 007/2018, utilizing 32 (thirty two) Sprague Dawley rats, under the responsibility of the researcher Gustavo Peçanha, agree with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethic Commission on Animal Use of the National Institute of Traumatology and Orthopedics, and was approved at the first meeting of the Commission on January 24, 2018).

Rio de Janeiro, 24 de Janeiro de 2018.

Assinatura: _____

Diego Pinheiro Aguiar

Coordenador da Comissão