**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANA PAULA FRANTTINI GARCIA MORENO GUIMARÃES

**Decanoato de nandrolona, qualidade óssea e calo ósseo em
fratura do fêmur de rato**

**Ribeirão Preto
2017**

ANA PAULA FRANTTINI GARCIA MORENO GUIMARÃES

**Decanoato de nandrolona, qualidade óssea e calo ósseo em
fratura do fêmur de rato**

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

Orientador: Prof. Dr. José Batista Volpon.

**Ribeirão Preto
2017**

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

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Guimarães, Ana Paula Frantini Garcia Moreno.

Decanoato de nandrolona, qualidade óssea e calo ósseo em fratura do fêmur de rato. Ribeirão Preto 2017.

94 f.: Il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Anabolizantes 2. Nandrolona 3. Fraturas do fêmur 4. Calo ósseo
5. Rato

Essa dissertação foi redigida de acordo com as Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Parte IV (Vancouver).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ana Paula Frantini Garcia Moreno Guimarães

Título: Decanoato de nandrolona, qualidade óssea e calo ósseo em fratura do fêmur de rato.

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

Área de Concentração: Reabilitação do Aparelho Locomotor

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Marcia Guimarães e Antônio Carlos Guimarães

Que sempre estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos. Que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos. Que me ajudaram em todas as fases da minha vida. Que me ensinaram que humildade e respeito pelo próximo são essenciais para a construção de caráter. Tenho orgulho em dizer que vocês são os melhores pais do mundo.

Aos meus irmãos, Anamaria Guimarães e Antônio Carlos Guimarães Filho

Que sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor e que sempre estiveram ao meu lado quando mais precisei.

Ao meu namorado, Ricardo de Felício Moreira

Pelo amor, companheirismo e carinho que fizeram diferença para a conclusão deste trabalho.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao professor **Dr. José B. Volpon**, pela importante orientação nessa Dissertação, por me dar a oportunidade de crescer academicamente, por ser solícito, por sempre responder as minhas dúvidas, e por estar presente nas dificuldades que enfrentei durante o Mestrado. Obrigada pela paciência e compreensão quando não correspondi às expectativas. Levarei para sempre comigo os momentos de convivência e aprendizagem. Meus sinceros agradecimentos.*

*Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, pela oportunidade, especificamente ao Professor **Dr. Marcelo Riberto** e ao Prof. **Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa**. À secretária Programa, **Rita de Cássia Stela Cossalter** que sempre me foi muito prestativa na orientação geral das normas e procedimentos do Programa.*

*À **Dra. Ariane Zamarioli**, que me apresentou ao Programa de Pós-Graduação, dando oportunidade de cursar o Mestrado, auxiliando-me e orientando-me na realização deste trabalho.*

*Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP: **Francisco Carlos Mazzocato, Maria Teresinha de Moraes, Reginaldo Trevilato Silva, Ismar Ribeiro**. Obrigada pela ótima convivência e ajuda prestada desde o início ao fim do Mestrado.*

*Às amigas de laboratório: **Maysa de Souza Campos, Mariana Maloste Butezloff, Patrícia Madalena San Gregório Guedes, Iara Inácio Botega, Gabriela Rezende Yanagihara, Bruna Leonel Carlos, Jéssica Suzuki Yamanaka, Brígida Batista Brancaleon e Roberta Carminati Shimano**, por fazerem meus dias mais divertidos e por todo auxílio com os procedimentos deste trabalho.*

*À **Maysa de Souza Campos**, que ao longo do tempo, tornou-se uma grande amiga e parceira de pesquisa. Obrigada pela ajuda com o procedimento experimental, análises e por sempre ser prestativa.*

*À **Larissa de Azevedo** pela ajuda com o procedimento experimental, por sempre me incentivar na realização deste trabalho, e por ter se tornado uma grande amiga.*

*Ao professor **Dr. Antônio Carlos Shimano** e à pós-graduanda **Gabriela Rezende Yanagihara** pelos ensinamentos e colaboração na realização de parte técnica desta pesquisa.*

À professora **Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por ser solícita e disponibilização do Laboratório onde realizei parte da análise histológica, bem como aos técnicos **Marco Antônio dos Santos, Nilza Letícia Magalhães, Fátima Aparecida Jacinto Leite e Marília Pacífico Lucisano**, pela ajuda na análise histológica.

Ao professor **Dr. João Paulo Mardegan Issa** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela colaboração e ensinamentos com parte da análise histológica. Às técnicas **Junia Ramos** e à **Ana Paula Macedo** do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela contribuição com as análises histológicas.

Ao meu irmão, **Antônio Carlos Guimarães Filho**, pela contribuição para a concepção da capa deste trabalho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro durante a pós-graduação.

*É o grau de comprometimento que determina o sucesso, não
o número de seguidores.*

J.K. Rowling

RESUMO

GUIMARÃES, A. P. F. G. M. **Decanoato de nandrolona, qualidade óssea e calo ósseo em fratura do fêmur de rato.** 92 f. 2017. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Tem havido grande interesse na investigação de substâncias de ação sistêmica que atuam sobre o sistema musculoesquelético, no sentido de melhorar a qualidade óssea e muscular, e assim, evitar fraturas patológicas decorrentes de osteoporose. Os esteroides anabólicos androgênicos têm importante atuação no metabolismo sistêmico geral, sendo que no osso aumenta sua resistência, massa e, no músculo, combate a sarcopenia. Entretanto, não há investigações consistentes sobre a possível atuação dessas substâncias na consolidação óssea. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do decanoato de nandrolona na consolidação óssea e na qualidade óssea de fêmures de ratos machos adultos jovens da linhagem *Wistar*. Foram utilizados 112 animais, divididos em 04 grupos com 02 subgrupos (14 e 28 dias). Um grupo controle (n=17) foi formado por animais sem intervenção, mas apenas com a injeção de veículo inerte. Em outro grupo foi provocada fratura da diáfise do fêmur (n=26). No terceiro grupo os animais receberam apenas decanoato de nandrolona (n=23). No quarto grupo foi provocada fratura na diáfise do fêmur associada à administração da mesma dosagem de decanoato de nandrolona (n=26). A fratura provocada no fêmur foi pelo método fechado e obtida com auxílio de uma guilhotina com lâmina romba. Em seguida, a fratura foi fixada por um fio de Kirschner de 1,0 mm de espessura, inserido no canal medular, e o membro pélvico foi radiografado em perfil. O decanoato de nandrolona foi aplicado na dose de 10 mg/kg de massa corporal, por via intramuscular, 02 vezes por semana, durante 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo. Após a eutanásia os fêmures direitos foram dissecados e tiveram o comprimento medido. A densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo foram determinados pelo método da absorciometria de raios X de dupla energia (DXA). A resistência óssea foi determinada pelo ensaio mecânico de flexão em dois pontos, com o cálculo com a da força máxima e rigidez. O calo ósseo foi avaliado microscopicamente em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina e examinados em luz comum para a obtenção do seu volume por técnica morfométrica. As outras secções foram coradas em *picrosirius red* e examinadas em luz polarizada para a quantificação do colágeno tipo I. A significância estatística foi estabelecida em 5%. Não houve diferença significativa entre os animais tratados e não tratados pelo decanoato de nandrolona quanto à densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo, resistência mecânica, tanto para o osso sem fratura, quanto para o calo ósseo. A quantidade de colágeno tipo I também não foi diferente, entretanto, o volume de osso neoformado nos grupos que receberam o esteroide anabolizante foi significativamente maior. A massa corporal foi maior nos grupos que receberam decanoato de nandrolona, embora sem significância estatística. O comprimento ósseo foi maior aos 28 dias no grupo tratado com decanoato de nandrolona. A massa do calo também teve valor significativamente maior aos 28 dias nos animais que receberam o decanoato de nandrolona. Com base nos resultados encontrados, sob as condições experimentais e métodos de avaliação empregados, o decanoato de nandrolona não causou efeitos significativos benéficos ou maléficos, tanto na qualidade do calo ósseo, como na qualidade do osso normal íntegro do rato adulto jovem.

Palavras-chave: Anabolizantes, nandrolona, fraturas do fêmur, calo ósseo, rato.

ABSTRACT

ABSTRACT

GUIMARÃES, A. P. F. G. M. **Nandrolone decanoate, bone quality and bone callus in rat femur fracture.** 92 f. 2017. Dissertation (Master degree) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

There has been a great interest in investigating systemic substances that can positively act on the musculoskeletal system to improve the bone quality thus avoiding osteoporotic fractures. The anabolic androgenic steroids have an important influence on general metabolism and can increase the bone resistance and bone mass. On muscle, it improves sarcopenic conditions. However, there is no consistent investigation of a possible action of these substances on bone callus. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of decanoate of nandrolone on fracture healing and bone quality of young adult male *Wistar* rats. One hundred animals were divided into 04 groups and 02 subgroups (14 and 28 days). A control group consisted of animals without any intervention (n=17). In the second group, a femoral shaft fracture was performed (n=26). In the third group, the animals received only decanoate of nandrolone (n=23). In the fourth group, a fracture in the femoral shaft was performed and associated with administration of the same dose of decanoate of nandrolone (n=26). The fracture created in the femur was obtained by closed method and achieved with the aid of a blunt blade guillotine. After that, the fracture was fixed with a 1.0 mm thick Kirschner wire that was inserted into the medullary canal, and the limb was X-rayed in profile. Ten mg/kg of body mass of decanoate of nandrolone was administered intramuscularly, 02 times a week for 14 or 28 days, depending on the subgroup. After euthanasia, the right femurs were dissected and had the length measured. Bone mineral density and bone mineral content were determined by the dual-energy x-ray absorptiometry method (DXA). The mechanical properties maximum force and stiffness were determined by the two-point bending test. The bone callus was evaluated microscopically in sections stained with hematoxylin and eosin and examined under ordinary light microscope to calculate the volume of bone callus by the morphometric technique. Other sections were stained in *picrosirius red* and examined under polarized light for quantification of type I collagen. The statistical significance was set at 5%. There was no significant difference between the animals treated and not treated with nandrolone decanoate for bone mass density, bone mineral content, mechanical resistance and type I collagen, both for the intact bone and for the bone callus. However, the body mass was higher in the groups that received nandrolone decanoate, although without statistical significance. The femur length was greater in the 28th day in the group treated with nandrolone decanoate. Callus mass also had significant increase at 28 days for animals that received nandrolone decanoate. Based on the results and under the experimental conditions and methods of evaluation, the decanoate of nandrolone did not cause significant benefit or harmful effects both on callus and on bone qualities.

Key words: Anabolic agents, nandrolone, femoral fractures, bone callus, rats.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de utilização dos animais nos grupos e subgrupos.....	49
Figura 2. Guilhotina utilizada para produzir a fratura fechada na diáfise femoral.....	50
Figura 3. Sequência ilustrativa dos principais passos técnicos da produção e fixação da fratura do fêmur. A-produção da fratura com auxílio da guilhotina de lâmina romba. B- posicionamento do rato para abordagem cirúrgica da fratura. C- incisão retilínea cutânea na face lateral da coxa, sobre a fatura. D- visualização direta para a verificação da adequação da fratura. E- primeiro passo da fixação com introdução do fio de Kirschner no canal medular do fragmento proximal. F- redução da fratura e avanço do fio pelo canal do fragmento distal até a região dos côndilos.....	51
Figura 4. Radiografia em perfil do membro pélvico direito realizada após a produção e fixação da fratura.....	52
Figura 5. Radiografia em perfil do membro pélvico de um rato controle, 28 dias após a fratura. É possível notar o alinhamento adequado dos fragmentos, a fixação intramedular com o fio de Kirschner e o calo ósseo externo formado, como indica a seta.....	53
Figura 6. Ilustração das figuras obtidas pelo escaneamento dos ossos para análise da densidade mineral óssea (tela geral). O detalhe mostra os fêmures fraturado e não fraturado escaneados, e as regiões de interesse (calo e metáfise distal) demarcadas com retângulos.....	54
Figura 7. Fotomicrografia do corte histológico do calo para identificação do osso neoformado. A região verde corresponde a outros tecidos sem interesse que foi apagada para que ficasse apenas o osso neoformado para a análise histomorfométrica. Hematoxilina e eosina, aumento original 1,25x.....	55
Figura 8. Fotomicrografia com luz polarizada da área do calo ósseo com a fibras colágenas tipo I selecionadas na cor verde claro (<i>Picrosirius red</i> , aumento original 50x).56	
Figura 9. Ilustração do ensaio mecânico em dois pontos em um fêmur, 28 dias após a fratura. É bem visível o calo ósseo na região central do osso. A extremidade condilar do fêmur foi incluída em um bloco esférico de resina acrílica, que foi presa a uma morsa de mesa. A força foi aplicada na extremidade proximal do fêmur (A) até que ocorresse a fratura (B).....	57
Figura 10. Fluxograma da utilização dos animais.....	59

Figura 11. Gráfico do ganho da massa corporal analisado durante quatro semanas nos quatros grupos.....	60
Figura 12. Comprimento dos fêmures nos grupos controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, aos 14 e 28 dias.....	61
Figura 13. Análise da densidade mineral óssea dos fêmures controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.....	62
Figura 14 Densidade mineral óssea do calo do fêmur nos diferentes grupos nos períodos de 14 e 28 dias.....	63
Figura 15. Área dos calos das fraturas, obtida pela densitometria óssea, nos grupos controle e fratura e decanoato de nandrolona com fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.....	64
Figura 16. Perímetro do calo ósseo nos grupos nos grupos controle e fratura e decanoato de nandrolona com fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.....	65
Figura 17. Análise do conteúdo mineral ósseo (CMO) dos fêmures direito nos grupos controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.....	66
Figura 18. Força máxima dos fêmures não fraturados nos grupos controle e decanoato de nandrolona, períodos de 14 e 28 dias.....	67
Figura 19. Força máxima dos fêmures fraturados nos grupos controle e decanoato de nandrolona, períodos de 14 e 28 dias.....	68
Figura 20. Rigidez dos fêmures fraturados nos grupos controle e decanoato de nandrolona, períodos de 14 e 28 dias.....	69
Figura 21. Rigidez nos grupos com fratura, com e sem decanoato de nandrolona, aos 14 e 28 dias.....	70
Figura 22. Fotomicrografia ilustrativa da região do calo ósseo 28 dias após a fratura. A - o calo ósseo dos animais controle mostra osso neoformado imaturo (*) e grande quantidade de tecido cartilaginoso (#). B -Animal do grupo decanoato de nandrolona com fratura apresenta grande quantidade de neoformação óssea e osso mais amadurecido (setas), bem como menor quantidade de tecido cartilaginoso. (Hematoxilina e eosina, aumento original 1,25x).....	70
Figura 23. Média do volume do osso neoformado no calo ósseo nos grupos com fratura, com e sem decanoato de nandrolona, aos 14 e 28 dias. Os animais com fratura e decanoato	

de nandrolona apresentaram volume do osso do calo significativamente maior ($p=0,001$) aos 28 dias.....71

Figura 24. Fotomicrografia com luz polarizada ilustrativa de região do calo ósseo 28 dias após a fratura. A - O calo ósseo dos animais decanoato de nandrolona mostra a deposição de fibras de colágeno tipo I na cor vermelho-alaranjada. B - Animal do grupo controle com fratura apresenta menor deposição de fibras de colágeno tipo I quando comparado ao grupo que recebeu decanoato de nandrolona (*Picrosirius red*, aumento original 50x).72

Figura 25. Média da área do colágeno tipo I entre os vários grupos, aos 14 e 28 dias. Não houve diferença significativa entre eles.....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CETEA - Comitê de ética de experimentação animal

CMO - Conteúdo mineral ósseo

CON - Grupo controle

CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal

DECA- Decanoato de nandrolona

DMO - Densidade mineral óssea

DXA - Densitometria óssea com dupla emissão de raios X

EA- Esteroide Anabolizante

EAA - Esteroide anabólico androgênico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FGF2 - Fator de crescimento fibroblástico

FMRP-USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FORP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

FRAT - Fratura óssea

HE - Hematoxilina-Eosina

IL-1 - Interleucinas 1

IL-6 - Interleucinas 6

MCSF - Colônia de macrófagos

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2 - Prostaglandina E2

PICRO - *pricrosirus red*

PRP - plasma rico em plaquetas

PTH - Paratormônio

PVPI - Polivinilpirrolidona

RANK-L - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

SPSS - Pacote estatístico para ciências sociais

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral

Wnt Signaling - Via de sinalização intracelular

LISTA DE SÍMBOLO E UNIDADE

LISTA DE SÍMBOLO E UNIDADE

μl - Microlitro

% - Porcentagem

°C- Grau Celsius

cm - Centímetro

g - Grama

kV - Quilovolt

mg - Miligrama

mg/g - miligrama por grama

mg/kg - Miligrama por quilograma

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mm/kg - Milímetro por quilograma

mm/min - Milímetro por minuto

μm - Micrômetro

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
1.1	Consolidação Óssea.....	31
1.2	Métodos não invasivos de estímulo do reparo ósseo.....	33
1.2.1	Estimulação elétrica.....	33
1.2.2	Ultrassom pulsado de baixa intensidade.....	34
1.2.3	Ondas de choque extracorpóreas.....	35
1.2.4	Terapia por vibração.....	35
1.2.5	Paratormônio (PTH).....	36
1.2.6	Bisfosfonatos.....	36
1.2.7	Denosumab.....	37
1.2.8	Estrogênio e Raloxifeno.....	37
1.2.9	Calcitonina.....	38
1.2.10	Teriparatida.....	38
1.2.11	Ranelato de estrôncio.....	38
1.3	Métodos de aplicação local do estímulo do reparo ósseo.....	39
1.3.1	Injeção de medula óssea autóloga.....	39
1.3.2	Fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2).....	39
1.3.3	Plasma rico em plaquetas (PRP).....	40
1.3.4	Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF).....	40
1.4	Decanoato de nandrolona no metabolismo ósseo.....	41
2	HIPÓTESE.....	45
3	OBJETIVO.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49

4.1	Animais experimentais.....	49
4.2	Grupos experimentais.....	49
4.3	Procedimento experimental para a produção da fratura no fêmur.....	50
4.4	Procedimento experimental – aplicação do decanoato de nandrolona.....	52
4.5	Análise da estrutura óssea.....	53
4.6	Densitometria óssea.....	53
4.7	Análise Histológica.....	54
4.7.1	Quantificação do osso neoformado.....	55
4.7.2	Quantificação do colágeno tipo I no calo ósseo.....	56
4.8	Avaliação da resistência mecânica.....	56
4.9	Análise estatística dos resultados.....	57
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Massa Corporal dos animais.....	59
5.2	Comprimento dos fêmures.....	60
5.3	Densidade mineral óssea.....	61
5.4	Conteúdo mineral ósseo.....	65
5.5	Análise Mecânica.....	66
5.5.1	Força Máxima.....	66
5.5.2	Rigidez.....	68
5.6	Microscopia Óptica.....	70
5.6.1	Volume de osso neoformado no calo.....	70
5.6.2	Fibra de colágeno no calo ósseo.....	71
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXOS.....	94

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) pertencem a um grupo de compostos naturais ou sintéticos derivados da testosterona, cuja indicação terapêutica clássica está associada a situações de hipogonadismo e deficiência do metabolismo proteico (1). Podem, também, ser recomendados como complementos no tratamento de doenças crônicas debilitantes, em situações de múltiplos traumas, queimaduras extensas e tratamento radioterápico (2).

Os EAA causam aumento global do anabolismo e síntese proteica, e diversos autores investigaram especificamente seus efeitos no metabolismo ósseo (3); (4). A testosterona atua positivamente sobre o tecido ósseo favorecendo a retenção de cálcio e fósforo, aumentando a síntese de matriz óssea por meio do aumento da atividade osteoblástica (5).

Na prática clínica, o decanoato de nandrolona é um anabolizante que atua positivamente na qualidade óssea, (6); (7); (8); (9); (10); (11); (12). Há outros derivados sintéticos da testosterona que são utilizados com a mesma finalidade, como o bolandiol (13), e o estanozolol (14); (15).

Segundo Ahmad et al, (2013) (7), o decanoato de nandrolona pode reduzir a perda óssea e melhorar a formação do calo ósseo, em animais. Quando essa substância é administrada em mulheres com osteoporose pós-menopausa causa aumento da massa óssea. Johansen et al, (1989) (16); Geusens et al, (1986) (17); Gennari et al, (1989) (18); Passeri et al, (1993) (19), observaram redução na incidência de fraturas osteoporóticas e aumento na massa óssea com a administração de nandrolona em mulheres, após a menopausa.

Em termos experimentais, a nandrolona é um esteroide anabolizante bastante investigado no estudo da qualidade óssea (7); (10); (20); (21); (6). Aerssens et al., (1993) avaliaram o efeito da administração do decanoato de nandrolona durante seis meses sobre ossos de ratas ovariectomizadas e observaram aumento significativo na formação de osso periosteal e no conteúdo mineral tanto do osso cortical, como trabecular, além de maior resistência à torção (10). Sun et al., (2013) provocaram lesão completa da medula espinhal em ratos tratados com decanoato de nandrolona, constatando que houve efeito do esteroide anabolizante em amenizar a perda da massa óssea nos membros paralisados (6).

Cardozo et al., (2010) trabalhando com a osteoporose de desuso e ratos submetidos à secção do nervo ciático concluíram que a administração de nandrolona foi capaz de minimizar a perda de massa óssea (22).

1.1 Consolidação Óssea

Cinco a 10% das fraturas podem desenvolver-se de forma atrasada ou mesmo não consolidar (23). Nos Estados Unidos, considera-se que o número de fraturas chegue a 7,9 milhões por ano, o que leva a um importante impacto nos sistemas de saúde (24). Entretanto, estes dados possivelmente estejam desatualizados e a situação atual pode ser pior.

A fratura do osso longo leva à perda da sua continuidade e das funções mecânicas no segmento lesado (25). Imediatamente, é desencadeada uma cascata de eventos em nível bioquímico e celular, com complexa sinalização molecular, cujo resultado final será o reparo ósseo completo (consolidação da fratura), ou seja, o restabelecimento da continuidade segmentar por tecido ósseo novo. A regeneração do osso fraturado recapitula os passos orquestrados da esqueletogênese que inclui as ossificações intramembranosa e endondral (26); (27). Em condições normais, o resultado, após longo período de remodelação, é um tecido regenerado indistinguível do osso contíguo normal, sem sinais de tecido cicatricial. Com efeito, o osso repara-se espontaneamente por um mecanismo de regeneração e não por proliferação fibrótica, como muitos tecidos. Existem dois tipos de osteogênese: aquele que passa pela formação de um calo ósseo (consolidação secundária) e o outro em que não há formação de calo ósseo, mas sim a proliferação de um ósteon de um fragmento para o outro (consolidação primária).

Para que a reparação óssea ocorra é necessário que células tronco mesenquimais do tecido circundante local e da circulação sistêmica, cheguem ao local da fratura, proliferem e diferenciem-se em três células fonte: condroblastos, osteoblastos e osteoclastos (28). Dessa forma, a consolidação óssea constitui um processo de recuperação natural e dependente de uma cascata osteogênica que recorda o período embrionário (29); (30). O calo ósseo forma-se por mecanismo intramembranoso e cartilaginoso. O primeiro ocorre pela contribuição periosteal, cujas células da camada mais profunda são estimuladas a se diferenciar em fibroblastos e, depois, osteoblastos, formando um calo primitivo que aumenta da periferia para o centro da fratura. Esta estruturação peculiar confere ao calo em formação maior eficiência na estabilização

mecânica. A ossificação endocondral desenvolve-se a partir de um modelo cartilaginoso. Em termos mais detalhados, imediatamente após a fratura, forma-se um hematoma em decorrência de lesões tissulares. Depois, plaquetas e macrófagos chegam ao foco da fratura e segregam citocinas inflamatórias, fator alfa, fator de necrose tumoral (TNF- α), prostaglandina (PGE₂), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), crescimento do fator de transformação beta (TGF- β), interleucinas 1 e 6 IL-1 e IL-6, prostaglandina (E₂), e o fator de necrose tumoral alfa. O resultado é a formação de uma cartilagem imatura, mas que fornecerá o modelo para a ossificação. Em última análise, essas células diferenciam-se em cartilagem, que sofrem apoptose e fornecem elementos para formar o tecido ósseo imaturo. Esta conversão de cartilagem para osso imaturo está associada à liberação de vários fatores, incluindo proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de insulina, osteocalcina, e, colágeno dos tipos 1, 5 e 11 (31). Depois, o osso imaturo desenvolve lamelas mais organizadas e, por meio da ação sincrônica de osteoblastos e osteoclastos e forma lamelas mais definidas (32). Esta fase está intimamente relacionada com expressões de interleucinas IL-1 e de IL-6 que aumentam a remodelação óssea, e diminuição do receptor ativador do fator nuclear kappa (RANK-L), fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (33).

Após a consolidação inicial, o osso recupera a continuidade e grande parte das propriedades mecânicas. Concomitantemente, ocorre a remodelação óssea que vai predominar à medida que o tempo passa e tem seu mecanismo centrado na ação de osteoblastos e osteoclastos, e forte interação com forças mecânicas. Com isso, aquele calo inicial, caracterizado por diferentes orientações trabeculares (*woven bone*, ou osso entrelaçado) vai sendo remodelado e trabéculas antigas são substituídas por novas, agora orientadas segundo as solicitações mecânicas. É a fase final da consolidação óssea e se completa tardiamente.

Embora os resultados do tratamento das fraturas tenham melhorado consideravelmente nos últimos anos, em virtude do maior conhecimento dos seus mecanismos e o respeito à biologia dos tecidos, parte delas ainda apresenta distúrbios de consolidação, principalmente em virtude da gravidade do trauma e de fatores sistêmicos que interferem negativamente no metabolismo (34).

O tecido ósseo tem robusta capacidade de regeneração, mas em torno de cinco a 10% das fraturas evoluem para distúrbios do reparo, cujo resultado será a consolidação atrasada, ou mesmo não consolidação, também conhecida como pseudartrose (23). Nesta

última circunstância a reparação ocorre por meio de intensa fibrose e pouca ou nenhuma cartilagem (35), de modo a exigir tratamento cirúrgico, associado a vários tipos de fixação.

As não consolidações trazem grandes limitações para o paciente em virtude da dor, mobilidade anormal dos fragmentos e deformidades. Quando localizadas em ossos longos dos membros inferiores impedem que haja sustentação. Nos Estados Unidos da América do Norte estima-se que, anualmente, haja 600.000 fraturas que evoluem para a não consolidação e 100.000 delas progridem até a pseudartrose, com impacto de 21 bilhões de dólares por ano no setor de saúde (36). Entretanto, estes dados devem ser desatualizados para menos no ano de 2016.

Essas evoluções espúrias da reparação óssea decorrem de fatores sistêmicos como idade avançada, doenças (e. g. diabetes), hábito de fumar, etc. (37); (38). Outras anomalias de consolidação decorrem de alterações locais como má circulação sanguínea, grande destruição de partes moles, tratamento inadequado, infecção, imobilização insuficiente, tipo de osso afetado, atraso no início do tratamento, etc. (39).

Assim, sempre houve busca por terapias não invasivas para tratar as fraturas que têm potencial de consolidação limitado, ou já com anomalias de consolidação que, por falta de condições clínicas do paciente, ou contraindicação cirúrgica em virtude de más condições locais, ou mesmo infecção, impedem que o tratamento cirúrgico seja instituído.

1.2 Métodos não invasivos de estímulo do reparo ósseo

De maneira geral, os métodos que tentam estimular a reparação óssea, especialmente as fraturas, podem ser agrupados em duas grandes categorias: 1- Aqueles que atuam sistemicamente e, 2- Aqueles que atuam no local da fratura. Nos dois grupos podem-se identificar procedimentos de natureza física e/ou biológica. A seguir é apresentado um resumo dos principais métodos. Entretanto, outras classificações podem ser encontradas, como, por exemplo, aquelas que levam em consideração o mecanismo de ação de fármacos (40).

1.2.1 Estimulação elétrica

Em 1957, Fukada e Yasuda mostraram que o osso seco apresentava piezeletricidade, isto é, a capacidade de apresentar cargas na superfície quando submetido à deformação. Potenciais eletropositivos surgiam no lado côncavo da deformação e eletronegativos no lado convexo (41). Em 1962, Basset e Becker demonstraram o mesmo efeito no osso fresco (42). Com base nesse fato, estes últimos pesquisadores propuseram que a aplicação de corrente elétrica em fraturas não consolidadas, por meio da implantação de eletrodos de corrente pulsada, poderia estimular a reparação óssea (método semi-invasivo). Entretanto, os resultados foram inconclusivos. Depois, vários estudos experimentais mostraram resultados que favoreciam um efeito positivo da eletroestimulação dos defeitos de consolidação (43); (44); (45), porém sem demonstração clínica cabal dos benefícios. Assim, a ideia evoluiu para a aplicação não invasiva da corrente elétrica, isto é, pela criação de um campo eletromagnético externo (46). Em 2008, uma metanálise sobre o tratamento do atraso de consolidação e pseudartrose por esse método concluiu que não havia evidência suficiente sobre sua eficiência (47). Atualmente, o método está praticamente abandonado.

1.2.2 Ultrassom pulsado de baixa intensidade

Acredita-se que o ultrassom pulsado de baixa intensidade aja por meio de ondas gerando estresses na região da fratura. Por meio da propriedade de mecanotransdução do osso haveria respostas biológicas, com estimulação da osteogênese (48); (49); (50).

Em 2008, uma investigação clínica bem planejada permitiu a conclusão de que o método é eficiente, seguro, mas leva muito tempo para apresentar resultados, pois implica em sessões diárias de 20 minutos de duração, em pelo menos três meses (51). Em 2009, um estudo de metanálise concluiu que o ultrassom quando aplicado em pacientes com fraturas recentes ou distúrbios de consolidação, não apresentou benefícios (52). Além disso, outra investigação clínica mostrou que, embora o ultrassom pudesse promover consolidação óssea, ele não necessariamente levaria ao retorno mais precoce da função (53).

Atualmente, na prática clínica esse método é reservado para casos específicos.

1.2.3 Ondas de choque extracorpóreas

Terapia por ondas de choque de aplicação local tem sido empregada no tratamento de anomalias de consolidação (54), com o intuito de provocar nos tecidos efeitos eletromagnéticos ou piezelétricos que estimulassem a reparação do defeito no osso. Em modelos animais conclui-se que esse tipo de estímulo determinaria liberação de fatores de crescimento que favoreceriam a consolidação óssea (55); (56). Uma metanálise publicada em 2004 concluiu que há evidências que essa terapia possa estimular a reparação óssea em casos de atraso de consolidação e pseudartroses (57). Entretanto, a aplicação clínica desse método nunca se popularizou.

1.2.4 Terapia por vibração

Diversos autores estudaram os efeitos do tratamento da terapia por vibração, que tem como característica ser um tipo de tratamento com baixa magnitude de ondas de vibração de alta frequência, o que proporciona estímulos mecânicos de uma forma não invasiva que é utilizada como recurso para acelerar o processo de cicatrização das fraturas, melhorar a qualidade óssea e acelerar a formação do calo ósseo (58); (59); (60); (61).

No estudo de Rubin et al., (2004) os autores avaliaram em mulheres na pós-menopausa, que períodos de 20 minutos de vibração de baixa intensidade (0,2 g, 30 Hz), inibe a perda óssea na coluna e no fêmur, aumentando significativamente a densidade mineral óssea nos indivíduos com massa corporal mais baixa (61).

Em estudos experimentais com defeitos ósseos, sem a formação do calo ósseo, alguns autores observaram uma melhor consolidação da fratura após a utilização da terapia por vibração (62); (63).

Além da terapia por vibração, alguns pesquisadores investigaram o efeito do salto na qualidade do osso com osteoporose e encontraram que exercícios de salto durante a descarga agem como inibidor da perda óssea o que aumenta a espessura do osso trabecular suprimindo a perda de trabéculas ósseas (64).

1.2.5 Paratormônio (PTH)

O PTH é produzido naturalmente e tem a função de ser o grande regulador do metabolismo mineral, e de grande atuação metabólica geral, usando o osso como elemento de reserva. Quando aplicado no tratamento da osteoporose aumenta a massa óssea e diminui a incidência de fraturas (65). Com relação à fratura em si, investigações clínicas em animais mostraram efeitos positivos na consolidação (66); (67); (68); (69).

Embora o mecanismo exato de atuação do PTH não esteja esclarecido, supõe-se que ele se ligue a células osteoprogenitoras (66). Há, ainda, evidências de que o PTH interage com a via Wnt-signaling para aumentar a ossificação intramembranosa (70). Estudos clínicos em humanos indicaram que essa terapia era positiva quando aplicada em mulheres com osteoporose pós-menopáusia com fratura pélvica (69), ou fraturas da extremidade distal do rádio (71). Entretanto, o alto custo inviabiliza a aplicação generalizada desse hormônio.

1.2.6 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos representam a classe mais amplamente usada no tratamento das afecções caracterizadas pelo aumento da atividade osteoclástica (72). Eles inibem a atuação osteoclástica e, assim, a reabsorção óssea. Há evidências mais recentes que indicam que eles inibem a apoptose de osteócitos e osteoblastos (73). Embora haja vários estudos mostrando atuação da reparação de fraturas pelos bisfosfonatos em animais de experimentação, a experiência clínica é limitada, de modo que este assunto demanda maiores estudos (74); (75).

Pesquisas que avaliaram o processo de consolidação óssea em osso osteoporótico humano e de animais, concordam com o tratamento com bisfosfonato e com a remodelação óssea tardia ao osso lamelar (76); (77); (78). No estudo de Manabe et al (2012), o bisfosfonato induziu a formação do calo ósseo na osteotomia, porém houve um atraso da remodelação óssea lamelar no osso do rato (79).

1.2.7 Denosumab

Conhecido por ser um anticorpo monoclonal, o denosumab atua com um mecanismo de ação que está diretamente ligado ao receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL). Esse anticorpo tem como característica diminuir a diferenciação e a função dos osteoclastos inibindo a reabsorção óssea (80).

Em uma comparação entre o alendronato e o denosumab, dois inibidores de osteoclastos, os autores Gerstenfeld et al, (2009) (81); Bukata et al, (2011) (77) investigaram efeitos similares na fase do reparo ósseo, onde o denosumab aumentou a formação de volume do calo ósseo atrasando o remodelamento tardio da fratura, porém, quantitativamente, tanto o alendronato, quanto o denosumab mostraram diferenças, onde os animais que receberam alendronato apresentaram apenas um aumento do conteúdo mineral ósseo, enquanto que os animais que receberam denosumab apresentaram maior volume do calo ósseo e maior densidade mineral óssea. No ensaio mecânico, os animais que receberam denosumab e alendronato apresentaram maior resistência em relação ao grupo controle.

1.2.8 Estrógeno e Raloxifeno

Raloxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno comumente utilizado para o tratamento da osteoporose. Tem como característica atuar como um agonista de estrógeno no osso inibindo a reabsorção óssea (80).

Apesar do estudo Stuermer et al, (2010) (82) apresentar dados limitados, o estrógeno e o raloxifeno mostraram uma melhor cicatrização da fratura no osso osteoporótico, com relação à formação do calo ósseo, da elasticidade e resistência. Solomon et. al (2009) relataram em pacientes idosos com fratura no úmero, o uso do raloxifeno não mostrou aumento nos riscos de uma não consolidação da fratura (83).

1.2.9 Calcitonina

A calcitonina é considerada um agente de segunda linha para o desenvolvimento da regeneração da fratura, não sendo esperada nenhuma aceleração na consolidação (30).

Em estudo com animais, a calcitonina aumentou a formação da cartilagem e auxiliou na consolidação do calo ósseo, resultando melhores propriedades biomecânicas (84). Com base nas análises radiológicas, biomecânicas e histomorfométricas, Manabe et al (2009), encontraram em macacos tratados com calcitonina que a remodelação do calo ósseo não tem efeito sobre o processo natural da consolidação de fratura, não alterando as propriedades do osso (85).

1.2.10 Teriparatida

É uma forma recombinante do hormônio da paratireoide, um agente anabólico. Em estudo com animais com modelo de osteoporose, o teriparatida mostrou que doses diárias administradas antes ou depois da fratura contribuem para uma melhora significativa na mineralização óssea, a densidade do calo ósseo, a massa óssea, e tornou o calo mais maduro e denso o que colaborou para a aceleração do processo de consolidação (86); (87); (88).

Na clínica, o teriparatida causou efeito positivo nos casos de não consolidação da fratura, e em casos de fraturas osteoporóticas (89); (90); (91).

1.2.11 Ranelato de estrôncio

Tem como característica ser um tratamento de primeira linha com efeito seguro no tratamento da osteoporose, diminuindo o risco de fraturas de quadril e vertebrae em mulheres (92).

Ranelato de estrôncio age de forma positiva na formação e a reabsorção óssea. Quando aplicado em estudos em animais, o ranelato aumentou a formação óssea acelerando a consolidação da fratura (30).

Em modelo animal, Komrakova et al, (2015) (93), encontraram que o ranelato de estrôncio apresentou efeitos anabólicos na consolidação óssea, além de estimular a formação do calo ósseo (94), atuando positivamente também no volume e na microarquitetura óssea (95).

1.3 Métodos de aplicação local do estímulo do reparo ósseo

Há substâncias que podem ser injetadas no local da fratura na tentativa de tratar falhas de consolidação.

1.3.1 Injeção de medula óssea autóloga

A medula óssea autóloga, geralmente obtida da crista ilíaca do próprio paciente, contém células multipotentes, tanto osteogênicas, quanto angiogênicas, que atuam no reparo ósseo. Com base nesta premissa, há relatos da injeção de medula óssea no local do defeito ósseo com a finalidade de estimular a osteogênese (96). Essa terapêutica foi usada por Hernigou et al, (2005) em 60 pacientes com pseudartroses assépticas de ossos longos, com obtenção de consolidação em 53 delas (97). Embora a injeção de medula óssea autóloga possa ser um método seguro e de baixo custo, há necessidade de maiores investigações para estabelecer seu real efeito e limitações, pois as publicações sobre o assunto são em pequeno número.

1.3.2 Fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2)

Os fatores de crescimento compõem uma família de polipeptídeos que desempenham importante papel na mitogênese de células tronco mesenquimais (98), sendo que o calo ósseo apresenta abundante expressão de fatores FGF. Entre esses fatores, o FGF-2 tem alta expressão nas fases precoces da formação óssea. Kawaguchi et al 2010,

injetaram hidrogéis com FGF-2 em fraturas recentes de tíbia e mostraram que os casos tratados apresentaram consolidação mais rápida do que os controles (99).

Entretanto, não há experimentos bem conduzidos que testam o uso desses fatores em anomalias de consolidação, além de o método ser custoso e elaborado, o que inviabiliza sua utilização em grandes populações.

1.3.3 Plasma rico em plaquetas (PRP)

As plaquetas, afora sua importante participação na coagulação sanguínea, possuem inúmeros fatores de crescimento que são liberados em processos de reparação nas lesões vasculares, ferimentos e fraturas ósseas. Embora o teste *in vitro* do PRP tenha mostrado que ele aumenta a proliferação de células osteoprogenitoras, aumenta a matriz extracelular, bem como a angiogênese (100), os trabalhos clínicos não corroboram esses achados. Em revisão sistemática, Sheth et al (2012) concluíram que não há evidências suficientes para recomendar o método (101).

1.3.4 Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF)

Esses fatores desempenham importante papel no processo de consolidação óssea com atração de neutrófilos, macrófagos, células progenitoras e interleucinas para o local da fratura. Os PDGF-BB foram ensaiados clinicamente com aplicação no local da fratura, com indícios de que estimulem o reparo (102).

Com esta breve revisão concluímos que a investigação de métodos que estimulam a formação do calo ósseo é assunto de grande interesse clínico, mas há falta de evidência científica, ou outra dificuldade como alto custo, que se faça optar por um deles.

Por esta razão, esta investigação pretende avaliar a possível ação positiva dos esteroides anabólicos androgênicos na consolidação óssea e apresentamos, a seguir, a revisão do assunto.

1.4 Decanoato de nandrolona no metabolismo ósseo

Entre os muitos derivados da testosterona, destaca-se pelo uso clínico o decanoato de nandrolona. Este anabolizante é caracterizado por ser o primeiro derivado sintético da testosterona sendo que suas propriedades anabólicas e androgênicas foram separadas para uso clínico (103); (104); (105). A redução dos efeitos androgênicos ocorre pela remoção do átomo de hidrogênio do grupo 19-metil, porém com manutenção dos efeitos anabólicos quando comparado com o proprionato de testosterona (106); (107).

É sabido que o decanoato de nandrolona tem efeito sobre o tecido muscular e ósseo (108); (109). Para que essa droga seja hidrolisada em nandrolona, é necessária a liberação de forma gradual por meio de aplicação intramuscular (106); (110), geralmente usando veículo oleoso. Na metanálise de Hofbauer et al, (1999), os autores citam estudos metabólicos realizados em humanos onde a nandrolona apresentou efeitos poupadores de proteínas, assim como efeitos positivos sobre o metabolismo de cálcio e aumento da massa óssea em humanos com osteoporose (111).

Esses efeitos anabólicos estão associados com a presença da enzima 5- α -redutase nos tecidos que contêm receptores androgênicos (112); (105). Essa enzima se liga de uma forma mais fraca aos receptores androgênicos do que a nandrolona (113), explicando, assim, o efeito relativamente forte da nandrolona em tecidos destituídos de alta atividade da 5- α -redutase.

Embora estudos prévios tenham mostrado a redução da incidência de fraturas osteoporóticas com o uso dos esteroides anabolizantes (15), há escassez de publicações quanto aos seus efeitos no processo de consolidação óssea propriamente dita (7).

Em estudos *in vitro* e *in vivo*, notou-se a presença de receptores androgênicos em células do tecido ósseo (114); (115); (116). Logo, os esteroides anabolizantes possuem atividade anabólica sobre o tecido ósseo (116).

O decanoato de nandrolona nos estudos de (117); (118); (119) foi capaz de reduzir a perda de massa óssea, reduzir a incidência de fraturas e melhorar o conteúdo mineral ósseo em mulheres na pós-menopausa.

Johansen et al., (1989) analisaram o efeito do decanoato de nandrolona em mulheres pós-menopausa com fratura vertebral e na região distal do antebraço. Os autores encontraram efeitos positivos no conteúdo mineral ósseo e concluíram que o esteroide aumentou a massa óssea por meio da diminuição da reabsorção óssea e do aumento da massa muscular (12).

Gueusens et al. (1986) observaram aumento na massa óssea em mulheres submetidas ao uso de nandrolona, o que causou redução de 40% na incidência de fraturas. Esses autores observaram, também, que o decanoato de nandrolona pode aumentar o conteúdo mineral ósseo e manter a espessura do osso cortical por um longo período, mesmo após a interrupção da administração do esteroide anabolizante (17).

Com relação à consolidação da fratura em si, não se encontram na literatura significantes ensaios clínicos que sugiram que essas substâncias exerçam efeitos benéficos (120); (121); (122); (123); (124). Assim, a controvérsia sobre a influência de fármacos na consolidação de fratura existe, embora a falha da fixação mecânica seja maior no osso osteoporótico, em comparação com o osso normal (125); (126).

Conquanto que o objetivo maior seja a prevenção de fraturas - campanhas públicas, conscientização no trânsito, prevenção de osteopatias, esporte protegido, etc. - a reparação sem intercorrências de uma fratura quando ela ocorre é altamente desejável, qualquer que seja o perfil do paciente. Isto levou à tentativa de melhorar a consolidação da fratura por meio de drogas que alterem diretamente o *turnover* ósseo.

No início da Introdução desta dissertação foi apresentado o *status quo* de várias tentativas para atuar na consolidação, ou em suas anomalias. Entretanto, há vasto campo de investigação envolvendo, educadores físicos, fisioterapeutas, endocrinologistas, pediatras, médicos veterinários, engenheiros biomédicos, reumatologistas, médicos do esporte etc., cada um tentando avaliar as vantagens e desvantagens de métodos de suas especialidades e tentativas em estabelecer um consenso.

Atualmente, a ação de agentes farmacológicos sistêmicos para aumentar a consolidação óssea em ambiente clínico ainda é controvertida (127); (128).

Farooqi et al (2014), em análise da literatura pela metodologia Cochrane sobre a utilização de esteroides anabolizantes e a reabilitação após cirurgia para fratura de região proximal do fêmur em idosos, separadamente, ou em combinação de suplementos nutricionais, concluíram que não há evidências suficientes para conclusões definitivas. Esses autores recomendaram que futuras pesquisas deveriam focar na avaliação da combinação da administração de esteroides anabolizantes e suplementos nutricionais (129).

Entretanto, ensaios clínicos futuros oferecerão a possibilidade de obter dados que tornarão possível a seleção de uma ou mais drogas, ou da associação delas, a fim de atuar positivamente no calo ósseo (130).

O único estudo experimental que encontramos envolvendo o decanoato de nandrolona na consolidação óssea foi realizado por Ahmad et al., (2013). Esses autores avaliaram os efeitos da aplicação intramuscular de decanoato de nandrolona na consolidação óssea de tíbias de coelhos e observaram resultados positivos com aumento na formação óssea e maior proliferação osteoblástica, além do aumento de colágeno (7). No entanto, essa pesquisa realizou uma abordagem relativamente superficial do assunto e o tamanho amostral foi muito reduzido.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A hipótese desta investigação é de um possível efeito positivo da administração do decanoato de nandrolona, tanto na consolidação de fraturas, como na qualidade óssea, de ratos normais.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Principal: avaliar os efeitos da administração do decanoato de nandrolona na consolidação da fratura do fêmur de ratos adultos jovens.

Secundário: avaliar os efeitos da administração do decanoato de nandrolona na qualidade do tecido ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 115/2014).

Foram utilizados 112 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, variedade Wistar), com massa corpórea inicial de 280 a 300 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP. Os ratos permaneceram em gaiolas coletivas do laboratório durante uma semana para aclimatização. Durante todo o período deste experimento foram mantidos sem restrição de acesso à água e ração, em temperatura ambiente de 20 a 24°C, controle de claro/escuro (12 x 12 horas) e controle da umidade relativa do ar em 55±10%.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, e subgrupos com seguimento de 14 e 28 dias após a fratura (Figura 1).

Grupo controle	<ul style="list-style-type: none"> • CON (n=14) – 14 dias. • CON (n=14) – 28 dias.
Grupo decanoato de nandrolona	<ul style="list-style-type: none"> • DECA (n=14) –14 dias. • DECA (n=14) –28 dias.
Grupo fratura	<ul style="list-style-type: none"> • FRAT (n=14) –14 dias. • FRAT (n=14) –28 dias.
Grupo fratura e decanoato de nandrolona	<ul style="list-style-type: none"> • FRAT+DECA (n=14) –14 dias. • FRAT+DECA (n=14) –28 dias.

Figura 1. Esquema de utilização dos animais nos grupos e subgrupos.

4.3 Procedimento experimental para a produção da fratura no fêmur

Após anestesia com a combinação de (1:1) de xilazina e cetamina 0,1 mg/100 g (cloridato de xilazina 2%, cloridato de cetamina 10%; Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, São Paulo) aplicada por via intramuscular na região glútea, foi feita a tricotomia na região pélvica e coxa direita. Em seguida, o membro posterior direito foi colocado sobre dois suportes metálicos de uma guilhotina confeccionada na Oficina Mecânica de Precisão do Campus da USP em Ribeirão Preto (Figura 2). Trata-se basicamente de uma alavanca inter-resistente, acionada manualmente e com dois suportes para o posicionamento das coxas do rato. A lâmina romba da guilhotina foi direcionada para o centro da coxa e baixada por controle manual até a quebra do osso, que era percebida pela perda abrupta da resistência, geralmente acompanhada de estalido típico.

Figura 2. Guilhotina utilizada para produzir a fratura fechada na diáfise femoral.

Depois, o animal foi transportado para o ambiente cirúrgico para a fixação da fratura. Foi colocado sobre colchão térmico, todo o membro pélvico foi tratado com solução antisséptica alcoólica polivinilpirrolidona-iodo (PVPI; Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo). Foi colocado campo cirúrgico fenestrado estéril de modo que a coxa ficasse exposta e operada segundo as condições usuais de assepsia e antisepsia (Figura 3). Foi realizada uma incisão retilínea de mais ou menos 1,0 cm, centrada sobre o meio da face lateral da coxa e, seguindo o septo intermuscular, foi abordada a região da fratura, com o cuidado em manter uma exposição mínima dos

fragmentos ósseos. A fratura foi inspecionada, verificando-se ou não sua adequação. Não foram selecionadas fraturas com vários fragmentos (mais do que quatro). Em seguida, houve a fixação da fratura que foi realizada pela passagem de um fio de Kirschner de aço de 1,0 mm de espessura colocado intramedularmente. Para isso, primeiro, o fio foi introduzido no canal intramedular do fragmento proximal até que saísse na região pélvica. A fratura foi reduzida sob visão direta e o fio avançado pelo canal do fragmento distal até a região dos côndilos. O fio foi recuado 1,0 mm e a parte excedente na região pélvica foi cortada e sepultada junto ao trocanter maior. O fechamento da incisão foi realizado pela aproximação da musculatura e pele, com fios 4-0 absorvíveis. A sutura cutânea ficou exposta, sem cobertura de curativos.

Figura 3. Sequência ilustrativa dos principais passos técnicos da produção e fixação da fratura do fêmur. A-produção da fratura com auxílio da guilhotina de lâmina romba. B- posicionamento do rato para abordagem cirúrgica da fratura. C- incisão retilínea cutânea na face lateral da coxa, sobre a fatura. D- visualização direta para a verificação da adequação da fratura. E- primeiro passo da fixação com introdução do fio de Kirschner no canal medular do fragmento proximal. F- redução da fratura e avanço do fio pelo canal do fragmento distal até a região dos côndilos.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, e com o animal ainda anestesiado, foi obtida imagem radiográfica por técnica digital em incidência em perfil do membro posterior.

Figura 4. Radiografia em perfil do membro pélvico direito realizada após a produção e fixação da fratura.

Para isso foram padronizadas: distância de 115 cm até o *cassete* digital (Kodak-View, Estados Unidos), parâmetros de 5 mA e 44 kV em aparelho (Siemens-Unimax 2B, Rio de Janeiro) (Figura 4). Verificada a adequação da fratura e da fixação, o animal foi levado para recuperar-se da anestesia em ambiente com temperatura controlada, recebendo injeções subcutâneas de dipirona (80 μ L de uma diluição 1:5 em solução fisiológica, IBASA 50%) a cada 8 horas por cinco dias. Por fim, foi aplicada solução anti mutilação (Petminato 100ml, Piracicaba-SP). Uma vez recuperado, o rato foi mantido em gaiolas coletivas.

4.4 Procedimento experimental – aplicação do decanoato de nandrolona

A aplicação do decanoato de nandrolona (Deca Durabolin 50mg, Schering Plough 1ml, São Paulo) ocorreu duas vezes por semana por via intramuscular na dose de 10mg/kg de massa corporal (131), por duas semanas (grupos DECA e FRAT+DECA) ou quatro semanas (grupos DECA e FRAT+DECA). Aos animais dos subgrupos CON 14 e 28, FRAT 14 e 28 foi administrado o mesmo volume de solução salina pela mesma via. Antes de cada administração, diariamente, foi determinada a massa corpórea dos animais para ajuste da dose de esteroide (121).

4.5 Análise da estrutura óssea

Para a eutanásia os ratos receberam dose excessiva de xilazina e quetamina (132) e uma nova radiografia foi obtida em perfil do membro posterior (mesma técnica já descrita) (Figura 5).

Figura 5. Radiografia em perfil do membro pélvico de um rato controle, 28 dias após a fratura. É possível notar o alinhamento adequado dos fragmentos, a fixação intramedular com o fio de Kirschner e o calo ósseo externo formado, como indica a seta.

O fêmur direito foi dissecado, o fio de Kirschner retirado dos fêmures e, após, foram obtidos o comprimento e o diâmetro do calo ósseo medido com paquímetro digital (Mitutoyo 200 mm precisão de 0,01 mm, São Paulo). Depois, os fêmures foram armazenados em etanol 70% para análises futuras.

4.6 Densitometria óssea

A densitometria óssea foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP com dupla emissão de raios-X (DXA) com uso do densitômetro Lunar DPX-IQ (Lunar®; software version 4.7e, GE Healthcare, United Kingdom). Foi utilizado o programa para exame em pequenos animais em modo de alta resolução. As aquisições de imagem foram realizadas com os ossos alinhados na mesma posição lado a lado e imersos sob profundidade de 5,0 cm de etanol 70%, em um recipiente plástico. Desta forma, os ossos foram escaneados em todo o comprimento.

As regiões de interesse foram estabelecidas por um retângulo abrangendo todo o calo ósseo (área do calo) e na metáfise distal do fêmur dos grupos não fraturado (Figura 6). Os valores da densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e área do calo ósseo foram obtidos diretamente pelo programa de computador.

Figura 6. Ilustração das figuras obtidas pelo escaneamento dos ossos para análise da densidade mineral óssea (tela geral). O detalhe mostra os fêmures fraturado e não fraturado escaneados, e as regiões de interesse (calo e metáfise distal) demarcadas com retângulos.

4.7 Análise Histológica

O processamento histológico ocorreu no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Seguiu técnica rotineira, com fixação em paraformaldeído 4%, descalcificação em EDTA 10%, desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Nos blocos, o espécime foi posicionado modo que a face posterior do fêmur ficasse voltada para baixo. Os cortes foram em sentido longitudinal no plano coronal por todo fêmur, com 05 micrômetros de espessura. De cada fêmur foram coletados 48 secções semisseriadas, em que após a coleta de oito cortes, os 10 cortes subsequentes foram descartados e o procedimento foi repetido até percorrer todo o calo ósseo. Os espécimes foram capturados em lâmina de vidro com polilisina, e posicionados dois cortes em cada lâmina. Das 24 lâminas obtidas, quatro foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), que permite observar as trabéculas e a medula óssea, e outras quatro lâminas foram coradas pelo *picrosirius red*, que permite a identificação das fibras colágenas.

A análise quantitativa foi realizada de forma padronizada no calo ósseo com ampliação de 12,5x para lâminas coradas com HE e 50x para aquelas coradas com *picrosirius red*, em microscópio óptico AxionImager® Z2 (Zeiss, Germany) com câmera digital (Zeiss®) acoplada e pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

4.7.1 Quantificação do osso neoformado

Nas amostras coradas por HE foi avaliada a área de osso neoformado. Para isso, toda a região central do calo ósseo foi selecionada, no aumento de 1,25x. Por meio do programa Axionvision® (Zeiss, Germany), foi selecionada a cor rosa roxa clara, indicativa de osso neoformado. A seleção da área de interesse foi feita com um clique sobre a área de interesse ficando marcado com a cor verde, porém as cores das imagens são parecidas, e o programa acaba marcando outras partes da figura que não fazem parte da região final de interesse. Dessa forma, por um mecanismo próprio do programa, e manualmente, foram apagadas as regiões sem interesse. A figura 7 ilustra esse processo.

Figura 7. Fotomicrografia do corte histológico do calo para identificação do osso neoformado. A região verde corresponde a outros tecidos sem interesse que foi apagada para que ficasse apenas o osso neoformado para a análise histomorfométrica. Hematoxilina e eosina, aumento original 1,25x.

4.7.2 Quantificação do colágeno tipo I no calo ósseo

A avaliação da área do colágeno I no calo ósseo foi realizada nos cortes corados em *picrosirius red*. A área delimitada foi de 3,5 x 2,5 mm em cada imagem, sendo feitas quatro imagens por calo ósseo, no aumento 50x. As lâminas foram analisadas em microscópio (Zeiss, Germany) sob luz polarizada e por meio da birrefringência foram identificadas as fibras colágenas tipo I em cor vermelho-alaranjada. A análise da densitometria óptica das fibras colágenas foi realizada com auxílio do programa Axionvision® que capta as diferentes tonalidades de vermelho. As quantificações das imagens foram feitas pela somatória das quatro imagens de cada calo ósseo para as fibras vermelhas tipo I. Os valores foram dados em μm^2 . Após o cálculo das médias das fibras I os dados foram transferidos no programa de estatística (SPSS versão 20.0).

A figura 8 ilustra a imagem com a marcação das fibras de colágeno tipo I. O programa Axionvision® selecionou a cor verde clara como interesse. Depois foi feita a análise automática pelo software, ficando marcado a cor vermelho alaranjada na figura final. (Figura 8).

Figura 8. Fotomicrografia com luz polarizada da área do calo ósseo com as fibras colágenas tipo I selecionadas na cor verde claro (*Picrosirius red*, aumento original 50x).

4.8 Avaliação da resistência mecânica

A análise da resistência mecânica dos fêmures direitos foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. O teste foi de flexão em dois pontos, em máquina universal de ensaios mecânicos EMIC® (DL10.000; Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, PR) munida de célula de carga de 50 kgf. Primeiro, a região condilar do fêmur direito foi incluída em um bloco esférico de resina acrílica (polimetilmetacrilato) que foi fixado a uma morsa. O posicionamento foi ajustado para colocar o osso na horizontal e com a face anterior para cima. Para aplicação da carga, foi padronizado o braço de alavanca de 23,0 mm que recebeu força vertical no sentido anteroposterior do fêmur, na velocidade de 0,5 mm/min. O programa Tesc® (EMIC Ltda, São José dos Pinhais-PR) foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento. As propriedades mecânicas analisadas foram força máxima e rigidez (Figura 9).

Figura 9. Ilustração do ensaio mecânico em dois pontos em um fêmur, 28 dias após a fratura. É bem visível o calo ósseo na região central do osso. A extremidade condilar do fêmur foi incluída em um bloco esférico de resina acrílica, que foi presa a uma morsa de mesa. A força foi aplicada na extremidade proximal do fêmur (A) até que ocorresse a fratura (B).

4.9 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se o comportamento paramétrico ou não dos dados. Foi utilizado o software SPSS versão 20.0. A comparação entre as variáveis das análises foi realizada pelo teste de modelos lineares generalizados, com ajuste de Bonferroni. Foi adotada a significância quando o $p \leq 0,05$. Para a formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5® (GraphPad Software, Inc, São Paulo).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

O fluxograma abaixo mostra a utilização dos animais no decorrer do experimento.

Figura 10. Fluxograma da utilização dos animais.

5.1 Massa Corporal

Foi obtida a média aritmética da massa corporal nos diferentes grupos, semanalmente. No início do experimento os animais não apresentaram diferença estatística (homogeneidade amostral inicial; $p > 0,05$). O ganho de peso foi observado em todos os grupos. Entretanto, no dia 7 foi observada diferença estatística nos ratos que receberam decanoato de nandrolona onde a variável anabolizante apresentou o ($p = 0,001$), a variável fratura também apresentou diferença estatística ($p = 0,012$). Não houve interação entre as duas variáveis ($p = 0,189$).

Nos seguintes dias do experimento (dia 14, dia 21 e dia 28), não houve diferença estatística significativa, onde o p da variável anabolizante foi ($p = 0,181$); ($p = 0,445$); ($p = 0,297$) e na variável fratura o p foi de ($p = 0,956$); ($p = 0,170$); ($p = 0,290$). Não houve

interação entre as variáveis nas três semanas finais de experimento ($p=0,683$); ($p=0,502$); ($p=0,656$). Apesar de não haver diferença estatística nas variáveis nos dias 14, 21 e 28, os animais que receberam decanoato de nandrolona tiveram maior média quando comparados aos grupos controle e controle fratura. A figura 11, mostra o gráfico do ganho de peso dos grupos experimentais ao longo das semanas.

Figura 11. Gráfico do ganho da massa corporal analisado durante quatro semanas nos quatros grupos.

5.2 Comprimento dos fêmures

Para a comparação do comprimento dos fêmures não fraturados foram utilizadas as variáveis, anabolizante e tempo. Na variável anabolizante, houve diferença significativa onde os grupos que receberam decanoato de nandrolona apresentaram maior comprimento do fêmur do que os controles ($p=0,001$). Já na variável tempo, não houve diferença estatística ($p=0,174$). A interação entre as variáveis não apresentou diferença significativa ($p=0,419$) (Figura12).

Figura 12. Comprimento dos fêmures nos grupos controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, aos 14 e 28 dias.

5.3 Densidade mineral óssea

A figura 13 ilustra a densidade mineral óssea (DMO) na metáfise distal dos ossos sem fratura, com e sem decanoato de nandrolona. Houve diferença significativa na variável tempo ($p=0,001$), onde o grupo de 28 dias apresentou valores maiores da DMO do que o grupo de 14 dias. Entretanto, com relação à variável anabolizante não houve diferença significativa ($p=0,566$). A interação entre as variáveis não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,261$).

Figura 13. Análise da densidade mineral óssea dos fêmures controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.

A densidade mineral óssea do calo foi significativa em relação à variável tempo ($p=0,001$), onde os fêmures dos animais de 28 dias apresentaram valores médios maiores da densidade mineral óssea do que os animais de 14 dias. A comparação com e sem anabolizante não apresentou diferença significativa ($p=0,925$), assim como a interação entre as variáveis ($p=0,681$) (Figura 14).

Figura 14. Densidade mineral óssea do calo do fêmur nos diferentes grupos nos períodos de 14 e 28 dias.

Pelo método densitométrico a área do calo não apresentou diferença significativa entre o controle e o anabolizante ($p=0,990$), bem como em relação ao tempo ($p=0,076$). A interação entre as variáveis anabolizante e tempo também não mostrou diferença estatística ($p=0,840$) (Figura 15).

Figura 15. Área dos calos das fraturas, obtida pela densitometria óssea, nos grupos controle e fratura e decanoato de nandrolona com fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.

Quanto ao perímetro do calo não houve diferença significativa em relação à variável anabolizante ($p=0,875$), em relação ao tempo ($p=0,103$) e na interação entre elas ($p=0,426$) (Figura 16).

Figura 16. Perímetro do calo ósseo nos grupos controle e fratura e decanoato de nandrolona com fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.

5. 4 Conteúdo mineral ósseo

O conteúdo mineral ósseo (CMO) dos grupos controle sem tratamento e controle anabolizante foi obtido pela densitometria óssea, na região da metáfise distal a partir de duas variáveis. O tempo foi significativo ($p=0,001$) sendo que os grupos de 28 dias tinham valor maior de CMO do que os de 14 dias. O decanoato de nandrolona não apresentou diferença estatística ($p=0,611$) assim como a interação entre as variáveis ($p=0,307$) (Figura 17).

Figura 17. Análise do conteúdo mineral ósseo (CMO) dos fêmures direito nos grupos controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, nos períodos de 14 e 28 dias.

5.5 Análise Mecânica

5.5.1 Força Máxima

Os valores médios da força máxima do fêmur não fraturado não foram estatisticamente diferentes nos grupos controle e o grupo que recebeu decanoato de nandrolona ($p=0,323$) e também em relação ao tempo ($p=0,022$). A interação entre as variáveis também se manteve sem resultado significativamente diferente ($p=0,542$) (Figura 18).

Figura 18. Força máxima dos fêmures não fraturados nos grupos controle e decanoato de nandrolona, períodos de 14 e 28 dias.

Já nos grupos controle e fratura e decanoato de nandrolona e fratura, o tempo influenciou ($p=0,001$). Os grupos de 28 dias apresentaram maior resistência do que os grupos de 14 dias. O anabolizante não apresentou influência significativa ($p=0,211$). A interação entre as variáveis também não mostrou diferença estatística ($p=0,749$) (Figura 19).

Figura 19. Força máxima dos fêmures fraturados nos grupos controle e decanoato de nandrolona, períodos de 14 e 28 dias.

5.5.2 Rigidez

A figura 20 apresenta os valores de rigidez nos diferentes grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos controle sem fratura e decanoato de nandrolona sem fratura, ($p=0,018$) e na variável tempo ($p=0,423$), assim como a interação entre as variáveis ($p=0,380$).

Figura 20. Rigidez dos fêmures fraturados nos grupos controle e decanoato de nandrolona, períodos de 14 e 28 dias.

Já a rigidez dos grupos controle com fratura e decanoato de nandrolona com fratura apresentou diferença estatística na variável tempo ($p=0,003$). Os grupos de 28 dias apresentaram maior rigidez quando comparados os grupos de 14 dias. A variável anabolizante não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,393$). A interação entre as variáveis também não apresentou diferença ($p=0,288$) (Figura 21).

Figura 21. Rigidez nos grupos com fratura, com e sem decanoato de nandrolona, aos 14 e 28 dias.

5.6 Microscopia Óptica

5.6.1 Volume de osso neoformado no calo

Figura 22. Fotomicrografia ilustrativa da região do calo ósseo 28 dias após a fratura. A - o calo ósseo dos animais controle mostra osso neoformado imaturo (*) e grande quantidade de tecido cartilaginoso (#). B - Animal do grupo decanoato de nandrolona com fratura apresenta grande quantidade de neoformação óssea e osso mais amadurecido (setas), bem como menor quantidade de tecido cartilaginoso. (Hematoxilina e eosina, aumento original 1,25x).

Na coloração HE foi possível notar aumento significativo ($p=0,001$) do volume de osso neoformado nos grupos que receberam decanoato de nandrolona. Na variável tempo, os grupos de 28 dias apresentaram maior valor significativo ($p=0,001$) quando comparados aos grupos de 14 dias. A interação entre as variáveis esteroide anabolizante e tempo também mostrou diferença estatística ($p=0,001$), o que indica que quanto mais tempo de uso do decanoato de nandrolona, maior o efeito do uso do medicamento.

O gráfico abaixo mostra as médias do volume do osso neoformado nos vários grupos.

Figura 23. Média do volume do osso neoformado no calo ósseo nos grupos com fratura, com e sem decanoato de nandrolona, aos 14 e 28 dias. Os animais com fratura e decanoato de nandrolona apresentaram volume do osso do calo significativamente maior ($p=0,001$) aos 28 dias.

5.6.2 Fibra de colágeno no calo ósseo

O porcentual da área de colágeno I não apresentou diferença significativa nos grupos controle fratura e esteroide anabolizante fratura para a variável esteroide anabolizante sendo o p do colágeno I ($p=0,778$). A variável tempo também não

apresentou diferença estatística no colágeno tipo I ($p=0,483$). A interação entre as variáveis também não apresentou diferença estatística ($p=0,537$).

Figura 24. Fotomicrografia com luz polarizada ilustrativa de região do calo ósseo 28 dias após a fratura. A - O calo ósseo dos animais decanoato de nandrolona mostra a deposição de fibras de colágeno tipo I na cor vermelho-alaranjada. B - Animal do grupo controle com fratura apresenta menor deposição de fibras de colágeno tipo I quando comparado ao grupo que recebeu decanoato de nandrolona (*Picrosirius red*, aumento original 50x).

Figura 25. Média da área do colágeno tipo I entre os vários grupos, aos 14 e 28 dias. Não houve diferença significativa entre eles.

6 DISCUSSÃO

Na sociedade moderna, com o aumento da expectativa de vida, aumenta o número de pessoas nas faixas etárias mais avançadas. Consequentemente, a epidemiologia populacional modifica-se e, com relação ao aparelho locomotor, há grande preocupação quanto à qualidade óssea, principalmente pela maior incidência de osteoporose senil, pós-menopáusica, andropáusica, medicamentosa, ou de outras causas.

Atualmente usam-se os termos síndrome da fragilidade caracterizada pela sarcopenia (diminuição da massa muscular) acompanhada de piora funcional, com comprometimento da independência e autonomia do idoso. Esta, por sua vez, predispõe à síndrome da fratura do idoso, causada pela diminuição da atividade física, mobilidade e massa óssea, com predisposição para quedas (129).

Uma fratura do terço proximal do fêmur no idoso (a segunda mais frequente nessa faixa etária) causa grande incapacidade, muitas vezes confina o indivíduo ao leito, favorecendo o aparecimento de escaras, pneumonia, infecção urinária, etc., que podem ser fatores decisivos na sobrevida após a cirurgia. Com efeito, muitos desses pacientes não voltam a andar, pois não somente a técnica cirúrgica é decisiva, mas também, a presença de comorbidades, subnutrição, falta de assistência no lar, alimentação inadequada, falta de assistência fisioterápica, etc.

O estado osteoporótico favorece a incidência de fraturas que nestas condições têm a reparação mais difícil, seja por comprometimento geral da saúde (diabetes, desnutrição, demência senil, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, etc.), seja por medicamentos como quimioterápicos, ou por fatores locais como dificuldade de fixação de implantes, comprometimento vascular do membro e do osso fraturado, etc. (40); (133).

O uso de drogas que diminuem a reabsorção óssea ou estimulam sua neoformação deve atuar como coadjuvante na prevenção e tratamento da osteoporose, principalmente em grupos de risco, como na fase pós-menopáusica, que afeta grande número de mulheres. Entre as drogas antirreabsortivas mais estudadas estão os bisfosfonatos (alendronato, pamidronato, rizedronato, zolendronato, etc), calcitonina, moduladores seletivos de receptores de estrógenos MSREs estrógenos, inibidores de ligantes RANK – sistema receptor ativador do fator nuclear kappa-B-, etc. Entre os anabólicos estão o paratormônio, ranelato de estrôncio, anticorpo antiesclerostina, esteroides anabolizantes, etc. A atual evidência apoia a continuação dessas terapias mesmo em pacientes que

sofrem fraturas em vigência do tratamento (40). Entretanto, alguns agentes terapêuticos sabidamente pioram a qualidade óssea como os corticoides, amplamente usados em tratamentos crônicos como nas doenças autoimunes.

Com relação à fratura, enquanto a atenção das investigações focou principalmente nas intervenções locais (fatores de crescimento, *scaffolds*, células tronco mesenquimais e estímulos mecânicos) estabelecidos no “modelo diamante” (134), o uso de drogas de efeito sistêmico com o objetivo de estimular o reparo da fratura ficou subestimado por anos (30). Entretanto, mais recentemente, muitas drogas passaram a ser testadas, como mostrado em nossa revisão.

A abordagem experimental laboratorial tem por objetivo realizar a seleção inicial desses fármacos, bem como investigar seus mecanismos de ação e efeitos colaterais. Na sequência, geralmente, surgem ensaios clínicos com séries menores, grandes séries, com ou sem desenho experimental adequado, e, finalmente, as revisões sistemáticas e metanálises para avaliação consistente dos resultados da literatura. Isso, sem abordar o uso veterinário clínico desses produtos. Neste contexto, situa-se este trabalho, ou seja, uma tentativa experimental para avaliar o uso do decanoato de nandrolona na melhora da qualidade do osso normal e na consolidação óssea normal. Interessantemente, em recente artigo de atualização essa droga não é citada por Vanucci et al., (2016). Estas mesmas autoras afirmam que ainda nenhum tratamento sistêmico foi suficientemente provado para a indução do reparo da fratura (40). Entretanto, o decanoato de nandrolona e o estanozolol estão clinicamente indicados para pessoas acima dos cinquenta anos que queiram combater a perda fisiológica de massa muscular e um eventual estado osteopênico. Os antirreabsortivos ósseos, embora mais amplamente usados, não atuam diretamente sobre o músculo e, teoricamente, apresentariam esta desvantagem e, sob este aspecto os antimetabólicos tem ação mais abrangente.

Pela literatura, sabe-se que alguns esteroides anabolizantes possuem atividade anabólica sobre o tecido ósseo (116). Porém, poucos estudos foram encontrados relacionados com a aplicação de decanoato de nandrolona na consolidação óssea (7). No estudo de Demling, (2000) os esteroides anabólicos androgênicos mostraram ser capazes de liberar fatores de crescimento beta pelos osteoblastos, o que poderia estimular a formação óssea (135). Lopes (2009), em sua tese de mestrado, provocou perfurações ósseas em tíbias de ratos, as preencheu com propionato de testosterona, e avaliou histologicamente a osteogênese. Não encontrou resultados diferentes entre os orifícios tratados e os controles (136).

A fratura óssea produzida no presente estudo foi feita através do método fechado por meio de trauma mecânico rombo e exposição mínima dos fragmentos para fixá-los. Esse tipo de fratura, assim como os eventos fisiológicos envolvidos para o reparo ósseo são mais semelhantes às fraturas observadas clinicamente. O modelo de fixação óssea utilizado nesse trabalho é adequado para manter a estabilização do fragmento seguindo, com variações, o modelo de Urabe et al, (2003) (137); Ogasawara et al, (2008) (138) é bastante usado em nosso laboratório.

A seleção do período experimental pós-fratura em 14 e 28 dias teve por base a biologia da consolidação da fratura do rato em que, aos 14 dias ocorre a fase de calo mole e, aos 28 dias, surge o calo ósseo duro.

O presente estudo avaliou a possível influência do decanoato de nandrolona, tanto no osso intacto, como em fraturas diafisárias do fêmur do rato normal. De acordo com os resultados, não houve diferença significativa para a maioria dos parâmetros estudados. A metodologia de avaliação da qualidade óssea já foi empregada em outras investigações e tem se revelada bastante sensível para esses propósitos (38); (139); (140).

Na prática clínica, as fraturas que requerem suporte terapêutico são aquelas em que o osso é de má qualidade, mas, decidimos usar ratos normais, adulto jovens, como uma primeira etapa para o teste com o decanoato de nandrolona. Entretanto, uma situação mais realista deve envolver ossos com a qualidade comprometida.

Os resultados da presente investigação contrariam nossa hipótese inicial do decanoato de nandrolona em apresentar eventual efeito positivo sobre o calo ósseo, ou sobre a qualidade óssea. Na literatura encontramos opiniões favoráveis e contrárias a essa ideia (17); (120), mas se relacionando principalmente com ossos de má qualidade.

Com relação aos diferentes parâmetros investigados, a massa corporal teve leve tendência para ser maior nos grupos que receberam decanoato de nandrolona, embora sem significado estatístico. Entretanto, o comprimento dos fêmures foi maior aos 28 dias no grupo tratado. Outro valor positivo foi que a massa do calo aos 28 dias foi claramente maior no grupo com decanoato de nandrolona. A deposição de osso neoformado foi significativamente maior nos animais que receberam o esteroide anabolizante. Esses três resultados estão de acordo com o efeito esperado do decanoato de nandrolona em atuar como estimulante do metabolismo. O colágeno é essencial para o reparo ósseo. Em nosso estudo, as fibras de colágeno tipo I não mostraram efeitos significantes, o que nos leva a concluir que o esteroide anabolizante não influenciou a interação com a matriz de colágeno.

Talvez, se o trabeculado ósseo fosse estudado com métodos mais refinados, por exemplo com técnicas morfométricas e aplicando os parâmetros definidos pela *American Society of Bone and Mineral Research* (141) pudéssemos detectar alguma alteração. Outra possibilidade seria estudar os parâmetros ósseos pela micrografia computadorizada. Mesmo com estes refinamentos metodológicos, se alguma diferença significativa fosse encontrada, ela seria tão sutil e, talvez, pouco importante do ponto de vista prático.

O ensaio mecânico, informa o estado funcional da estrutura óssea, pois a força máxima representa a resistência do osso e a rigidez informa como ele se deforma. Ainda assim não encontramos diferença para o calo ou osso íntegro em relação ao tratamento. O ensaio mecânico mais comum em nosso laboratório é o de três pontos, mas, em nossos ossos verificamos que o pino central da máquina de ensaio localizava-se sobre o calo, causando uma deformação local, sem solicitar significativamente o corpo de prova, o que poderia comprometer os resultados. Uma alternativa seria o ensaio em quatro pontos, o que evitaria o apoio direto sobre o calo ósseo. Entretanto, o vão mínimo para esse tipo de ensaio deve ser igual a duas vezes o diâmetro do osso, o que não foi possível fazer em virtude das pequenas dimensões do fêmur (38).

Para conjecturar sobre os resultados inesperados encontrados poderiam ser lembradas algumas possibilidades:

- 1- Dose inadequada do decanoato de nandrolona. Esta situação poderia ocorrer, mas usamos dados de literatura que recomendam o uso de 10 mg/kg de decanoato de nandrolona duas vezes por semana (131). Os autores que usam sobredoses estavam interessados em avaliar os possíveis efeitos colaterais do excesso do medicamento (142); (143).
- 2- Embora as fraturas que requerem suporte terapêutico específico sejam aquelas osteoporóticas ou do osso de má qualidade, optamos, como primeiro passo, experimentar o decanoato de nandrolona em osso normal. Este pode ter sido um fator limitante da ação do fármaco e um viés importante da metodologia, pois a ação mais positiva do esteroide poderia ser mais necessária e notável no osso osteoporótico.
- 3- Outra possibilidade seria o tempo de aplicação do fármaco, que também teve por base o trabalho de Saito et al, (2009) (131); Bronson et al, (1996) (144), que usaram tempos mais prolongados de aplicação de esteroides androgênicos, mas estavam interessados nos efeitos colaterais por tempo prolongado. Além disso, em nossa metodologia, o tempo de administração ficou limitado à biologia da formação do calo ósseo.

4- Os animais que utilizamos foram ratos adultos jovens. No estudo de Jannatifar et al, (2015) (142) os autores compararam doses suprafisiológicas de esteroides anabolizantes em ratos jovens e maduros e não encontraram diferenças com relação às alterações no aparelho genital. Entretanto, o osso, sabidamente um tecido resistente, poderia responder de maneira diferente em relação à faixa etária e este pode ter sido um viés em nosso desenho.

Assim, com base nessas considerações, consideramos as seguintes propostas para uma futura experimentação com decanoato de nandrolona:

- 1- Utilizar ratos machos adultos maduros submetidos à lesão do nervo ciático para desencadear osteoporose regional e provocar a fratura.
- 2- Administrar o decanoato por tempo mais prolongado.
- 3- Avaliar os resultados, com metodologia usada neste experimento, mas também associando estudos do metabolismo ósseo por técnicas de biologia molecular e microtomografia computadorizada.

Finalmente, o efeito comprovado dos esteroides anabolizantes, especialmente do decanoato de nandrolona, em eliminar gordura e aumentar a massa muscular, o que tem levado ao uso abusivo dessa droga por esportistas e fisicultores, para aumentar o desempenho físico, obtido em comércio ilegal e clandestino (145). Um estudo mostrou que 1 a 3 milhões de homens e mulheres nos Estados Unidos da América do Norte usam esteroides em doses 10 a 100 vezes maiores do que níveis fisiológicos, isso em 2015 (145).

Essas doses abusivas levam a efeitos colaterais danosos e perigosos. Está suficientemente demonstrado que doses excessivas de esteroides anabolizantes apresentam aumento do comportamento agressivo, tanto em camundongos fêmeas, (146) quanto em ratos machos (147). Outros importantes efeitos sobre o aparelho urogenital também foram detectados (142); (148); (145).

Estes achados servem de alerta para a prescrição dessas drogas em doses suprafisiológicas, principalmente na faixa etária em que a osteoporose é mais prevalente, favorecendo o desenvolvimento de câncer de próstata e outros tumores, pilosidade, alterações de pele, agressividade, atrofia testicular, peniana, calvície entre outros.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Sob as condições experimentais e métodos de avaliação empregados nesta investigação o decanoato de nandrolona não causou efeitos significativos benéficos ou maléficos, tanto na qualidade do calo ósseo, como na qualidade do osso normal íntegro do rato adulto jovem.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Cunha TS, Cunha NS, Moura mJCS, Marcondes FK. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2004;165-79.
2. Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG, Jr. Treatment of anabolic-androgenic steroid dependence: Emerging evidence and its implications. *Drug Alcohol Depend.* 2010;109(1-3):6-13.
3. Kopera H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. *Acta endocrinologica Supplementum.* 1985;271:11-8.
4. Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróide Anabolizantes no Esporte. *Revista Brasileira Medicina Esporte* 2002:235-43.
5. Canali ED, Kruel LFM. Respostas Hormonais ao Exercício *Revista Paul Educação Física* 2001:141-53.
6. Sun L, Pan J, Peng Y, Wu Y, Li J, Liu X, et al. Anabolic steroids reduce spinal cord injury-related bone loss in rats associated with increased Wnt signaling. *J Spinal Cord Med.* 2013;36(6):616-22.
7. Ahmad F, Yunus SM, Asghar A, Faruqi NA. Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits - a study on experimental model. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(1):93-6.
8. Cardozo CP, Qin W, Peng Y, Liu X, Wu Y, Pan J, et al. Nandrolone slows hindlimb bone loss in a rat model of bone loss due to denervation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010;1192:303-6.
9. Gadeleta SJ, Boskey AL, Paschalis E, Carlson C, Menschik F, Baldini T, et al. A physical, chemical, and mechanical study of lumbar vertebrae from normal, ovariectomized, and nandrolone decanoate-treated cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone.* 2000;27(4):541-50.
10. Aerssens J, Vanaudekercke R, Geusens P, Schot LPC, Osman AAH, Dequeker J. Mechanical-Properties, Bone-Mineral Content, and Bone-Composition (Collagen, Osteocalcin, Igf-I) of the Rat Femur - Influence of Ovariectomy and Nandrolone Decanoate (Anabolic-Steroid) Treatment. *Calcified Tissue Int.* 1993;53(4):269-77.
11. Hassager C, Jensen LT, Johansen JS, Riis BJ, Melkko J, Podenphant J, et al. The carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in serum as a marker of bone formation: the effect of nandrolone decanoate and female sex hormones. *Metabolism.* 1991;40(2):205-8.
12. Johansen JS, Hassager C, Podenphant J, Riis BJ, Hartwell D, Thomsen K, et al. Treatment of postmenopausal osteoporosis: is the anabolic steroid nandrolone decanoate a candidate? *Bone Miner.* 1989;6(1):77-86.
13. Page ST, Marck BT, Tolliver JM, Matsumoto AM. Tissue selectivity of the anabolic steroid, 19-nor-4-androstenediol-3beta,17beta-diol in male Sprague Dawley rats: selective stimulation

of muscle mass and bone mineral density relative to prostate mass. *Endocrinology*. 2008;149(4):1987-93.

14. Beneton MNC, Yates AJP, Rogers S, McCloskey EV, Kanis JA. Stanazolol Stimulates Remodeling of Trabecular Bone and Net Formation of Bone at the Endocortical Surface. *Clin Sci*. 1991;81(4):543-9.

15. Inkovaara J, Gothoni G, Halttula R, Heikinheimo R, Tokola O. Calcium, Vitamin-D and Anabolic-Steroid in Treatment of Aged Bones - Double-Blind Placebo-Controlled Long-Term Clinical-Trial. *Age Ageing*. 1983;12(2):124-30.

16. Johansen JS, Hassager C, Podenphant J, Riis BJ, Hartwell D, Thomsen K, et al. Treatment of Postmenopausal Osteoporosis - Is the Anabolic-Steroid Nandrolone Decanoate a Candidate. *Bone and Mineral*. 1989;6(1):77-86.

17. Geusens P, Dequeker J. Long-term effect of nandrolone decanoate, 1 alpha-hydroxyvitamin D3 or intermittent calcium infusion therapy on bone mineral content, bone remodeling and fracture rate in symptomatic osteoporosis: a double-blind controlled study. *Bone Miner*. 1986;1(4):347-57.

18. Gennari C, Agnusdei D, Gonnelli S, Nardi P. Effects of nandrolone decanoate therapy on bone mass and calcium metabolism in women with established post-menopausal osteoporosis: a double-blind placebo-controlled study. *Maturitas*. 1989;11(3):187-97.

19. Passeri M, Pedrazzoni M, Pioli G, Butturini L, Ruys AH, Cortenraad MG. Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. *Maturitas*. 1993;17(3):211-9.

20. Adami S, Rossini M. Anabolic steroids in corticosteroid-induced osteoporosis. *Wiener medizinische Wochenschrift*. 1993;143(14-15):395-7.

21. Need AG, Horowitz M, Bridges A, Morris HA, Nordin BE. Effects of nandrolone decanoate and antiresorptive therapy on vertebral density in osteoporotic postmenopausal women. *Archives of internal medicine*. 1989;149(1):57-60.

22. Cardozo CP, Qin WP, Peng YZ, Liu X, Wu Y, Pan JP, et al. Nandrolone slows hindlimb bone loss in a rat model of bone loss due to denervation. *Skeletal Biology and Medicine*. 2010;1192:303-6.

23. Einhorn TA. Enhancement of Fracture-Healing. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 1995;77a(6):940-56.

24. Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? *Indian J Orthop*. 2009;43(2):117-20.

25. Merloz P. Macroscopic and microscopic process of long bone fracture healing. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2011;22(6):1999-2001.

26. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev*. 1999;87(1-2):57-66.

-
27. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998(355 Suppl):S7-21.
 28. Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Advances in wound care*. 2013;2(6):306-16.
 29. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1993(289):292-312.
 30. Brandi ML. Healing of the bone with anti-fracture drugs. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(11):1441-7.
 31. Foss B, Ulvestad E, Bruserud O. Platelet-derived growth factor (PDGF) in human acute myelogenous leukemia: PDGF receptor expression, endogenous PDGF release and responsiveness to exogenous PDGF isoforms by in vitro cultured acute myelogenous leukemia blasts. *Eur J Haematol*. 2001;67(4):267-78.
 32. Borrelli J, Jr., Pape C, Hak D, Hsu J, Lin S, Giannoudis P, et al. Physiological challenges of bone repair. *Journal of orthopaedic trauma*. 2012;26(12):708-11.
 33. Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):2003-6.
 34. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(3):133-43.
 35. Volpon JB. Nonunion Using a Canine Model. *Arch Orthop Traum Su*. 1994;113(6):312-7.
 36. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW. Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012;20(5):273-82.
 37. Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM, Group LS. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. *J Orthop Trauma*. 2005;19(3):151-7.
 38. Santiago HA, Zamarioli A, Sousa Neto MD, Volpon JB. Exposure to Secondhand Smoke Impairs Fracture Healing in Rats. *Clin Orthop Relat Res*. 2017;475(3):894-902.
 39. Buza JA, 3rd, Einhorn T. Bone healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2016;13(2):101-5.
 40. Vannucci L, Brandi ML. Healing of the bone with anti-fracture drugs. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(17):2267-72.
 41. Fukada E, Yasuda I. On the Piezoelectric Effect of Bone. *J Phys Soc Jpn*. 1957;12(10):1158-62.
 42. Bassett CAL, Becker RO. Generation of Electric Potentials by Bone in Response to Mechanical Stress. *Science*. 1962;137(3535):1063-&.
 43. Korenstein R, Somjen D, Fischler H, Binderman I. Capacitative pulsed electric stimulation of bone cells. Induction of cyclic-AMP changes and DNA synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1984;803(4):302-7.

-
44. Brighton CT, Okereke E, Pollack SR, Clark CC. Invitro Bone Cell Response to a Capacitively Coupled Electrical-Field - the Role of Field-Strength, Pulse Pattern, and Duty Cycle. *Clin Orthop Relat R*. 1992(285):255-62.
 45. Brighton CT. The Treatment of Non-Unions with Electricity. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 1981;63(5):847-51.
 46. Scott G, King JB. A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(6):820-6.
 47. Mollon B, da Silva V, Busse JW, Einhorn TA, Bhandari M. Electrical Stimulation for Long-Bone Fracture-Healing: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2008;90a(11):2322-30.
 48. Siska P, Gruen GS, Menzel C, Pape HC. External adjuncts to enhance fracture healing What is the role of ultrasound? *Unfallchirurg*. 2009;112(1):6-14.
 49. Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog Biophys Mol Bio*. 2007;93(1-3):384-98.
 50. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(1):26-34.
 51. Pounder NM, Harrison AJ. Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: A review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. *Ultrasonics*. 2008;48(4):330-8.
 52. Busse JW, Kaur J, Mollon B, Bhandari M, Tornetta P, Schuenemann HJ, et al. Low intensity pulsed ultrasonography for fractures: systematic review of randomised controlled trials. *Brit Med J*. 2009;338.
 53. O'Herlihy L, Elkins MR. Ultrasound may promote fracture healing but this does not necessarily accelerate return of function. *Br J Sports Med*. 2013;47(6):397-8.
 54. Valchanou VD, Michailov P. High-Energy Shock-Waves in the Treatment of Delayed and Nonunion of Fractures. *International Orthopaedics*. 1991;15(3):181-4.
 55. Wang FS, Yang KD, Wang CJ, Huang HC, Chio CC, Hsu TY, et al. Shockwave stimulates oxygen radical-mediated osteogenesis of the mesenchymal cells from human umbilical cord blood. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004;19(6):973-82.
 56. Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, Chang PR, Huang YT, Sun YC, et al. Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1 alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10331-7.
 57. Zelle BA, Gollwitzer H, Zlowodzki M, Buhren V. Extracorporeal Shock Wave Therapy: Current Evidence. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2010;24:S66-S70.
 58. Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res*. 2006;21(9):1464-74.

-
59. Leung KS, Shi HF, Cheung WH, Qin L, Ng WK, Tam KF, et al. Low-magnitude high-frequency vibration accelerates callus formation, mineralization, and fracture healing in rats. *J Orthop Res*. 2009;27(4):458-65.
60. Shi HF, Cheung WH, Qin L, Leung AH, Leung KS. Low-magnitude high-frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. *Bone*. 2010;46(5):1299-305.
61. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res*. 2004;19(3):343-51.
62. Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, et al. Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 2010;87(2):168-80.
63. Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, et al. Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcif Tissue Int*. 2013;92(6):509-20.
64. Ju YI, Sone T, Okamoto T, Fukunaga M. Jump exercise during remobilization restores integrity of the trabecular architecture after tail suspension in young rats. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(6):1594-600.
65. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *New Engl J Med*. 2001;344(19):1434-41.
66. Barnes GL, Kakar S, Vora S, Morgan EE, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Stimulation of fracture-healing with systemic intermittent parathyroid hormone treatment. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2008;90a:120-7.
67. Holzer G, Majeska RJ, Lundy MW, Hartke JR, Einhorn TA. Parathyroid hormone enhances fracture healing - A preliminary report. *Clin Orthop Relat R*. 1999(366):258-63.
68. Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, et al. 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*. 2010;25(2):404-14.
69. Peichl P, Holzer LA, Maier R, Holzer G. Parathyroid Hormone 1-84 Accelerates Fracture-Healing in Pubic Bones of Elderly Osteoporotic Women. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2011;93a(17):1583-7.
70. Kakar S, Einhorn TA, Vora S, Miara LJ, Hon G, Wigner NA, et al. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007;22(12):1903-12.
71. Khan SN, Bostrom MPG, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin N Am*. 2000;31(3):375-+.
72. Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998;19(1):80-100.

-
73. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2012;68(7):1013-8.
74. Xue DT, Li FC, Chen G, Yan SG, Pan ZJ. Do bisphosphonates affect bone healing? A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res*. 2014;9.
75. Volpon JB, Cecim PES, Miyase CI, Gava NF. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2008;43(10):442-251.
76. Kates SL, Ackert-Bicknell CL. How do bisphosphonates affect fracture healing? *Injury*. 2016;47 Suppl 1:S65-8.
77. Bukata SV. Systemic administration of pharmacological agents and bone repair: what can we expect. *Injury*. 2011;42(6):605-8.
78. Hao Y, Wang X, Wang L, Lu Y, Mao Z, Ge S, et al. Zoledronic acid suppresses callus remodeling but enhances callus strength in an osteoporotic rat model of fracture healing. *Bone*. 2015;81:702-11.
79. Manabe T, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Iwata K, Komatsubara S, et al. Effect of dosing interval duration of intermittent ibandronate treatment on the healing process of femoral osteotomy in a rat fracture model. *Calcif Tissue Int*. 2012;90(3):193-201.
80. Black DM, Rosen CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2016;374(3):254-62.
81. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, et al. Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):196-208.
82. Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, et al. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395(2):163-72.
83. Solomon DH, Hochberg MC, Mogun H, Schneeweiss S. The relation between bisphosphonate use and non-union of fractures of the humerus in older adults. *Osteoporosis Int*. 2009;20(6):895-901.
84. Hegde V, Jo JE, Andreopoulou P, Lane JM. Effect of osteoporosis medications on fracture healing. *Osteoporos Int*. 2016;27(3):861-71.
85. Manabe T, Mori S, Mashiba T, Cao Y, Kaji Y, Iwata K, et al. Eel calcitonin (elcatonin) suppressed callus remodeling but did not interfere with fracture healing in the femoral fracture model of cynomolgus monkeys. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2009;27(3):295-302.
86. Manabe T, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Iwata K, Komatsubara S, et al. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone*. 2007;40(6):1475-82.
87. Campbell EJ, Campbell GM, Hanley DA. The effect of parathyroid hormone and teriparatide on fracture healing. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(1):119-29.

88. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res.* 2002;17(11):2038-47.
89. Miyakoshi N, Horikawa A, Shimada Y. Nonsurgical Corrective Union of Osteoporotic Vertebral Fracture with Once-Weekly Teriparatide. *Case Rep Orthop.* 2015;2015:784360.
90. Chintamaneni S, Finzel K, Gruber BL. Successful treatment of sternal fracture nonunion with teriparatide. *Osteoporos Int.* 2010;21(6):1059-63.
91. Oteo-Alvaro A, Moreno E. Atrophic humeral shaft nonunion treated with teriparatide (rh PTH 1-34): a case report. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010;19(7):e22-8.
92. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2004;350(5):459-68.
93. Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, et al. The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int.* 2015;97(4):391-401.
94. Bruel A, Olsen J, Birkedal H, Risager M, Andreassen TT, Raffalt AC, et al. Strontium is incorporated into the fracture callus but does not influence the mechanical strength of healing rat fractures. *Calcif Tissue Int.* 2011;88(2):142-52.
95. Goldhahn J, Feron JM, Kanis J, Papapoulos S, Reginster JY, Rizzoli R, et al. Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(5):343-53.
96. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-36.
97. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions - Influence of the number and concentration of progenitor cells. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume.* 2005;87a(7):1430-7.
98. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* 2004;20(11):563-9.
99. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, et al. A Local Application of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2 for Tibial Shaft Fractures: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2010;25(12):2459-67.
100. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery A REVIEW OF THE LITERATURE. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume.* 2009;91b(8):987-96.
101. Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, et al. Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma Use for Orthopaedic Indications: A Meta-Analysis. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume.* 2012;94a(4):298-307.

102. DiGiovanni CW, Lin SS, Baumhauer JE, Daniels T, Younger A, Glazebrook M, et al. Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB and Beta-Tricalcium Phosphate (rhPDGF-BB/beta-TCP): An Alternative to Autogenous Bone Graft. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2013;95a(13):1184-92.
103. Saranteas T, Mourouzis C, Mezitis M, Tesseromatis C, Spyraiki C. Interaction between nandrolone decanoate and calcitonin in bone formation markers (osteocalcin and bone specific alkaline phosphatase) and IGF-I in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;2(2):167-70.
104. Barceloux DG, Palmer RB. Anabolic-androgenic steroids. *Dis Mon*. 2013;59(6):226-48.
105. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*. 2008;154(3):502-21.
106. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev*. 2005;105(9):3352-70.
107. Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther*. 2001;23(9):1355-90.
108. Piovesan RF, Fernandes KP, Alves AN, Teixeira VP, Silva Junior JA, Martins MD, et al. Effect of nandrolone decanoate on skeletal muscle repair. *Int J Sports Med*. 2013;34(1):87-2.
109. Ghizoni MF, Bertelli JA, Grala CG, da Silva RM. The anabolic steroid nandrolone enhances motor and sensory functional recovery in rat median nerve repair with long interpositional nerve grafts. *Neurorehabil Neural Repair*. 2013;27(3):269-76.
110. Ferry A, Vignaud A, Noirez P, Bertucci W. Respective effects of anabolic/androgenic steroids and physical exercise on isometric contractile properties of regenerating skeletal muscles in the rat. *Arch Physiol Biochem*. 2000;108(3):257-61.
111. Hofbauer LC, Khosla S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur J Endocrinol*. 1999;140(4):271-86.
112. Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, Ziegler R. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997;12(3):464-71.
113. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2886-95.
114. Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(10):3493-7.
115. Vanderschueren D, Bouillon R. Androgens and bone. *Calcif Tissue Int*. 1995;56(5):341-6.
116. Sinnesael M, Claessens F, Boonen S, Vanderschueren D. Novel insights in the regulation and mechanism of androgen action on bone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;20(3):240-4.
117. Beriashvili GK, Menabde GT, Chikhladze RT. [Morphological peculiarities of consolidation of experimental mandible fractures by osteosynthesis using Kollapan and retabolil]. *Georgian Med News*. 2006(136):105-8.

-
118. Tidermark J, Ponzer S, Carlsson P, Soderqvist A, Brismar K, Tengstrand B, et al. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone in lean elderly women with femoral neck fractures. *Clin Nutr*. 2004;23(4):587-96.
119. Tengstrand B, Cederholm T, Soderqvist A, Tidermark J. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone on bone tissue after a hip fracture. *Clin Nutr*. 2007;26(4):460-5.
120. Craig SJ, Youssef PP, Vaile JH, Sullivan L, Bleasel JF. Intravenous zoledronic acid and oral alendronate in patients with a low trauma fracture: experience from an osteoporosis clinic. *Intern Med J*. 2011;41(2):186-90.
121. Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2002;17(12):2237-46.
122. Langeland N. Effects of oestradiol-17 beta benzoate treatment on fracture healing and bone collagen synthesis in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1975;80(3):603-12.
123. Hao YJ, Zhang G, Wang YS, Qin L, Hung WY, Leung K, et al. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone*. 2007;41(4):631-8.
124. Meyer RAJ, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 2001;19(3):428-35.
125. Bannister GC, Gibson AG, Ackroyd CE, Newman JH. The fixation and prognosis of trochanteric fractures. A randomized prospective controlled trial. *Clin Orthop Relat Res*. 1990(254):242-6.
126. Sadowski C, Lubbeke A, Saudan M, Riand N, Stern R, Hoffmeyer P. Treatment of reverse oblique and transverse intertrochanteric fractures with use of an intramedullary nail or a 95 degrees screw-plate: a prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(3):372-81.
127. Brandi ML. Drugs for bone healing. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(8):1169-76.
128. Goldhahn J, Scheele WH, Mitlak BH, Abadie E, Aspenberg P, Augat P, et al. Clinical evaluation of medicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. *Bone*. 2008;43(2):343-7.
129. Farooqi V, van den Berg ME, Cameron ID, Crotty M. Anabolic steroids for rehabilitation after hip fracture in older people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(10):CD008887.
130. Goldhahn J, Little D, Mitchell P, Fazzalari NL, Reid IR, Aspenberg P, et al. Evidence for anti-osteoporosis therapy in acute fracture situations--recommendations of a multidisciplinary workshop of the International Society for Fracture Repair. *Bone*. 2010;46(2):267-71.
131. Saito M, Shiraishi A, Ito M, Sakai S, Hayakawa N, Mihara M, et al. Comparison of effects of alfacalcidol and alendronate on mechanical properties and bone collagen cross-links of callus in the fracture repair rat model. *Bone*. 2009;46(4):1170-9.

-
132. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, (2013).
133. MacKenzie EJ, Bosse MJ, Pollak AN, Webb LX, Swiontkowski MF, Kellam JF, et al. Long-term persistence of disability following severe lower-limb trauma. Results of a seven-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(8):1801-9.
134. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S3-6.
135. Demling RH. Oxandrolone, an anabolic steroid, enhances the healing of a cutaneous wound in the rat. *Wound Repair Regen*. 2000;8(2):97-102.
136. Lopes RR. Avaliação da ação tópica da testosterona sobre o tecido ósseo e sua relação com a estimulação da neoformação óssea. Estudo em ratos machos. [Dissertação]. Porto Alegre Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2009.
137. Urabe K, Kim HJ, Sarkar G, Bronk JT, Bolander ME. Determination of the complete cDNA sequence of rat type II collagen and evaluation of distinct expression patterns of types IIA and IIB procollagen mRNAs during fracture repair in rats. *J Orthop Sci*. 2003;8(4):585-90.
138. Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, Goto K, Yamazaki M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*. 2008;43(5):832-9.
139. Falcai MJ, Zamarioli A, Leoni GB, de Sousa Neto MD, Volpon JB. Swimming Activity Prevents the Unloading Induced Loss of Bone Mass, Architecture, and Strength in Rats. *Biomed Res Int*. 2015;2015:507848.
140. Zamarioli A, Maranhão DA, Butezloff MM, Moura PA, Volpon JB, Shimano AC. Anatomic changes in the macroscopic morphology and microarchitecture of denervated long bone tissue after spinal cord injury in rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:853159.
141. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610.
142. Jannatifar R, Shokri S, Farrokhi A, Nejatbakhsh R. Effect of supraphysiological dose of Nandrolone Decanoate on the testis and testosterone concentration in mature and immature male rats: A time course study. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2015;13(12):779-86.
143. Breuer ME, McGinnis MY, Lumia AR, Possidente BP. Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. *Horm Behav*. 2001;40(3):409-18.
144. Bronson FH. Effects of prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;53(2):329-34.
145. Sena Ade S, Vargas RA, Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Morphometric study of the corpus cavernosum after anabolic androgenic steroid administration in pubertal and adult rats. *Acta Cir Bras*. 2015;30(7):478-83.
146. Bronson FH, Nguyen KQ, De La Rosa J. Effect of anabolic steroids on behavior and physiological characteristics of female mice. *Physiol Behav*. 1996;59(1):49-55.

147. Lumia AR, Thorner KM, McGinnis MY. Effects of chronically high doses of the anabolic androgenic steroid, testosterone, on intermale aggression and sexual behavior in male rats. *Physiol Behav.* 1994;55(2):331-5.
148. Vargas RA, Oliveira LP, Frankenfeld S, Souza DB, Costa WS, Favorito LA, et al. The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats. *Int Braz J Urol.* 2013;39(5):675-82.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 115/2014, sobre o projeto intitulado "*Estudos dos efeitos osteogênicos de esteroides anabolizantes na consolidação óssea após fratura experimental em ratas*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Batista Volpon** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de setembro de 2014.

We certify that the protocol nº 115/2014, entitled "*Study of the osteogenic effects of anabolic steroids on the bone healing following experimental fracture in rats*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 09/29/2014.

Ribeirão Preto, 29 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP