



Naiana Viana Viola Nícoli

**“Efeito da administração intermitente de PTH
no tecido ósseo de ratos irradiados”**

Piracicaba
2013



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

Naiana Viana Viola Nícoli

**“Efeito da administração intermitente de PTH
no tecido ósseo de ratos irradiados”**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Buco-Dental na Área de Histologia e
Embriologia..

Este exemplar corresponde à versão final
da Tese defendida pela aluna Naiana Viana Viola Nícoli
e orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

Assinatura do Orientador

Piracicaba
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

N545e Nícoli, Naiana Viana Viola, 1981-
Efeito da administração intermitente de PTH no tecido ósseo
de ratos irradiados / Naiana Viana Viola Nícoli. -- Piracicaba, SP :
[s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Rocha Marques.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Teriparatida. 2. Osso e ossos. 3. Irradiação corporal total. I.
Marques, Marcelo Rocha. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of intermittent PTH administration on bone tissue of
rats irradiated

Palavras-chave em Inglês:

Teriparatide

Bone and bones

Whole-body irradiation

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutora em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Marcelo Rocha Marques [Orientador]

Nádia Fayez Omar

Maria Luiza Ozores Polacow

Pedro Duarte Novaes

Paula Cristina Anibal

Data da defesa: 15-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 15 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata NAIANA VIANA VIOLA NÍCOLI aprovada.

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

Profa. Dra. NÁDIA FAYEZ OMAR

Profa. Dra. MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

Profa. Dra. PAULA CRISTINA ANIBAL

Dedicatória Especial

Vocês são os grandes responsáveis por mais esta conquista!

Ao bom ***Deus***, por sempre iluminar meu caminho, guiar meus passos e pela Graça de estar simplesmente viva, e de poder ter chegado até aqui. Sei que somente o Senhor tudo pode e que somente ao seu lado tudo de bom poderei ter.

Ao meu pai ***João Geraldo (Joza)***, pelo seu imenso amor e carinho constante. Homem extremamente inteligente, honesto, digno e competente em tudo que fez; e que com certeza passou suas virtudes aos seus filhos. Você pedia força e saúde para me ver formar na Faculdade, mas Deus não quis assim, pois ele tinha uma missão maior, precisava de você ao seu lado, para juntos estenderem as mãos sobre mim e me abençoar, expandir minhas fronteiras e me livrar de todo o mal. É por isto que sei que continuas “vivo” sempre ao meu lado, de uma forma muito mais poderosa, pois hoje você, é no céu grande luz, brilhando na imensidão e iluminando minha vida.

À minha mãe ***Nirvana***, pelo seu amor incondicional, pela sua sempre e verdadeira amizade, pelo confiança e apoio em todas as minhas decisões e por sacrificar e dedicar toda a sua vida a mim e aos meus irmãos. A senhora é um exemplo de dignidade, honestidade, luta e força, enfim, de mãe e mulher. Hoje, mais do que nunca, tenho que te agradecer por ser esta pessoa tão completa: mãe e também pai, companheira, educadora e minha melhor amiga. Sem a senhora eu nada seria!

Ao meu marido, ***Giovanni***, pelo carinho, atenção, companheirismo, presença, paciência e confiança. Obrigado por sempre me apoiar, estimular e me compreender nos momentos difíceis da minha formação profissional, sempre lutando ao meu lado por minhas conquistas. Você é uma pessoa incrível que só enriquece e alegra a minha vida!

Agradecimentos

Aos meus irmãos e padrinhos, ***Eliana e Adriano***, sempre incentivadores e orgulhosos de mim. Agradeço pelo carinho, amizade, companheirismo e que, mesmo a distância, sempre me ajudaram e torceram por mim.

A minha sobrinha e afilhada, ***Helena***, minha moça linda, presente de Deus nas nossas vidas. Por sempre se orgulhar e se espelhar em sua madrinha, pelo seu carinho e amor tão puro e sincero. Te amo minha futura dentista!

Ao meu orientador, ***Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques***, obrigada pela oportunidade e pela confiança.

Ao doutorando, ***Alessandro Hakme***, da Universidade de São Paulo – USP/São Carlos, pelos ensinamentos, orientação e colaboração nas análises de microtomografia computadorizada.

Agradeço ***a todos os professores que compõem esta banca***, pela sua disponibilidade, compreensão e por enriquecerem este trabalho através de seus conhecimentos.

Aos ***professores, funcionários e colegas de pós-graduação***, pelos ensinamentos, ajuda, boa convivência e pelo companheirismo.

As boas e verdadeiras amizades aqui formadas e que mesmo a distância o carinho e o respeito sempre irão permanecer! ***Nádia, Yamba, Liza, Juliana e Eliene***, obrigada pela presença, companhia, apoio e incentivo em vários momentos importantes na minha vida.

***“Não tenha medo de momentos difíceis: transcenda-os. Não tenha medo da
exaustão: continue. Não tenha medo do perigo: desafie-o. Não tenha medo de
morrer: agarre suas oportunidades.”***

PROVÉRBIO CHINÊS

Resumo

A deteriorização do tecido ósseo representa um dos efeitos colaterais da irradiação ionizante nas estruturas adjacentes às regiões irradiadas. O PTH (hormônio da paratireóide) é um hormônio vital na homeostase, de forma que é o principal regulador do metabolismo do íon cálcio. A administração intermitente deste hormônio pode induzir aumentos acentuados na formação de osso. Considerando a necessidade da regularização aos danos provocados ao tecido ósseo pela irradiação, o objeto deste estudo foi avaliar o efeito da administração intermitente de PTH no tecido ósseo de ratos submetidos à irradiação de corpo inteiro. Foram utilizados 27 ratos divididos 3 grupos de 9 animais cada: Grupo Controle (CONT), Grupo Irradiado (RAD) e Grupo Irradiado+PTH (RAD+PTH). Após irradiação do corpo inteiro, com dose única, não letal de 8 Gy, foi administrado PTH de forma intermitente (dia sim/dia não) por 24 dias. Transcorridos os 24 dias de tratamento intermitente com PTH, os animais foram sacrificados e as tíbias, hemimandíbulas e fêmures removidos. Foi realizada a pesagem da tíbia e hemimandíbula direita, depois foram congeladas a -20°C para posterior análise em microtomografia computadorizada (μ CT). Na tíbia e hemimandíbula esquerda, foi realizada a análise histológica morfométrica da área óssea, número de osteócitos e osteoclastos; os fêmures foram submetidos aos ensaios mecânicos de microdureza Knoop, resistência à compressão e flexão. Os resultados mostraram que o Grupo CONT apresentou maior área óssea da cortical lingual do segundo molar que o Grupo RAD e RAD+PTH, e maior número de osteoclastos e área óssea da região de furca do primeiro molar em comparação ao Grupo RAD. Em uma análise histológica qualitativa da tíbia, o Grupo RAD e RAD+PTH apresentaram tecido adiposo em meio ao tecido medular. Grupo RAD+PTH apresentou melhor resposta no ensaio de resistência à compressão, necessitando de uma maior força (Newton) para causar a deformação no fêmur em comparação ao Grupo CONT e Grupo RAD. Na pesagem (grama) das peças, as tíbias apresentaram-se mais pesadas no RAD+PTH em relação ao RAD e CONT. Entretanto, houve uma queda acentuada no número de animais somente no Grupo

RAD+PTH durante o tratamento com PTH, ocorrendo a morte de 6 dos 9 animais iniciais. Na análise por μ CT, os animais do Grupo RAD+PTH apresentaram maior volume ósseo da tíbia que os dos demais grupos. Estes resultados mostram que o PTH promove melhora nas propriedades ósseas pós-irradiação, entretanto a associação da administração de PTH com a irradiação de corpo inteiro pode ser letal.

Palavras chaves: teriparatida, osso e ossos, irradiação corporal total.

Abstract

The deterioration of bone tissue adjacent to the irradiated regions is a common effect of ionizing radiation. PTH is the main regulator of the metabolism of calcium ion. The intermittent administration of this hormone can induce marked increases in bone formation. Considering the necessity of settling the damage caused by radiation to bone, the object of this study was to evaluate the effect of intermittent PTH administration on bone tissue quality of rats subjected to whole body irradiation. It was used 27 rats which were assigned in 3 groups of 9 animals: a Control group (CONT), Irradiation Group (RAD) and Irradiation+PTH Group (RAD+PTH). After whole body irradiation of single-dose non-lethal of 8 Gy, during 24 days it was administered PTH intermittently (one time per 48hs) to the RAD+PTH group, and placebo was administered to the other groups (CONT and RAD). After 24 day of treatment, the animals were sacrificed and tibias, femurs and mandible removed. Were weighed right hemimandible and tibia, then were frozen at -20 ° C for further analysis in computed microtomography (μ CT). Lefts tibias and hemimandibles were prepared to morphometric analysis of bone area, number of osteocytes and osteoclasts. Both femurs were submitted to mechanical tests: Knoop microhardness, compressive and bending test. The results showed that the CONT group showed greater cortical bone area in the hemimandibles and the RAD Group and RAD+PTH and increased number of osteoclasts and bone area of the furcation region of the first molar in compared to the RAD Group. In a qualitative histological analysis, RAD and RAD+PTH group showed that medullar tissue is replaced by adipose tissue. RAD+PTH group showed a better response in the compressive test, requiring more force (Newton) to cause deformation in the femur compared to the CONT and RAD Group. When the weighing (g) of the parts, the tibia showed up in the heavier RAD+PTH compared to RAD and CONT group. However, there was a large decrease in the number of animals only at RAD+PTH group during treatment with PTH, occurring 6 deaths of the 9 initial

animals. The analysis by μ CT, animals of Group RAD+PTH had higher bone volume of the tibia than of other groups. These results show that PTH promotes improvement in bone quality after irradiation. However the association of PTH administration with whole body irradiation can be lethal.

Keywords: teriparatide, bone and bones, whole-body irradiation

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	PTH – Fisiológico	3
2.2	PTH – Anabólico	4
2.3	Irradiação e PTH	8
3	PROPOSIÇÃO	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Experimento	12
4.1.1	Processamento Histológico	15
4.2	Forma de análise	15
4.2.1	Análise morfométrica - H&E	15
4.2.2	Análise morfométrica – TRAP	15
4.2.3	Ensaio mecânicos	16
4.2.4	Microtomografia computadorizada	18
5	RESULTADOS	20
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO	57

1 Introdução

A irradiação ionizante é frequentemente utilizada no tratamento de doenças como o câncer de mama, linfomas, sarcomas e carcinomas, e comumente é possível observar efeitos colaterais em decorrência deste tipo de tratamento. Dentre os efeitos colaterais já relatados em estruturas adjacentes às regiões irradiadas, tem-se a deterioração óssea, a qual pode resultar em fraturas por estresse, fragmentação óssea, e degeneração articular (Costantino *et al.*, 1995; Jegoux *et al.*, 2010). De fato, os dados disponíveis sobre a irradiação ionizante e tecido ósseo indicam que ela tem potencial para causar efeitos adversos significativos sobre o esqueleto, incluindo também atrasos na cicatrização óssea (Brown *et al.* 1991), danos à placa de crescimento (Damron *et al.*, 2003), osteonecrose (Jereczek-Fossa *et al.*, 2002), e, em casos raros, neoplasia (Shaheen *et al.*, 2006).

Várias mudanças histológicas ocorrem após irradiação incluindo perda de osteócitos, ausência de osteoblastos na superfície óssea, fibrose vascular e substituição de medula óssea por tecido adiposo (Arnold *et al.*, 1995). Entretanto, não há prevenção ou tratamentos bem definidos para injúrias induzidas pela radiação no tecido osso (Caoa *et al.*, 2011).

O hormônio da paratireóide (PTH) é um hormônio vital na homeostase, de forma que é o principal regulador do metabolismo do íon cálcio (Aspenberg *et al.*, 2010; Bashutski *et al.*, 2010). A exposição contínua de PTH promove no organismo reabsorção óssea, enquanto que a administração pulsátil do hormônio pode induzir aumentos acentuados na formação de osso (Andreassen *et al.*, 1999). Atualmente o PTH é o único agente anabólico permitido pelo FDA para uso clínico no tratamento da osteoporose (Neer *et al.* 2001; Aspenberg *et al.*, 2010; Bashutski *et al.*, 2010). Seu uso é intensamente investigado não apenas na prevenção de fraturas (Andreassen *et al.*, 1999), mas também, no tratamento de defeitos ósseos localizados, tais como fraturas e defeitos craniofaciais (Aspenberg *et al.*, 2010; Bashutski *et al.*, 2010; Seebach *et al.*, 2004), distração

osteogênica (Skripitz *et al.*, 2005), fixação de implante (Wu *et al.*, 2010) e mais atualmente trabalhos mostram uma melhora através da administração de PTH no tecido ósseo afetado pelos efeitos adversos da irradiação (Arrington *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2011).

Durante condições fisiológicas normais, o PTH estimula a formação óssea e reabsorção óssea, e em pacientes com hiperparatireoidismo primário, a perda óssea é frequente. No entanto, o desenvolvimento da medida bioquímica da molécula de PTH na década de 1980 levou-nos a compreender a regulação da secreção de PTH e o metabolismo do cálcio, que em seguida preparou o caminho para a utilização de PTH como um tratamento anabólico da osteoporose quando administrado de forma intermitente, tendo forte efeito na formação de tecido ósseo. Isso não poderia ter acontecido sem o conhecimento básico alcançado pelas medições bioquímicas do PTH. Os efeitos anabólicos do PTH na formação óssea podem ser explicados pela assim chamada "janela anabólica", a qual significa que durante o tratamento com PTH, a formação óssea é superior à reabsorção óssea durante os primeiros 6-18 meses. Isto se deve aos seguintes mecanismos: o PTH regula a expressão de c-fos em células ósseas; o IGF é essencial para o efeito anabólico de PTH; as células de revestimento ósseo são direcionadas a se diferenciarem em osteoblastos; há um aumento da adesão das células tronco mesenquimais a superfície óssea; o PTH tem um efeito anti-apoptótico direto em osteoblastos e o PTH também diminui os níveis da proteína esclerostina, removendo assim a inibição da sinalização Wnt, o qual é necessário para as ações anabólicas do PTH (Kramer *et al.*, 2010; Bellido *et al.*, 2012).

Assim, os efeitos do tratamento intermitente com PTH emergem através de uma complexa rede de vias. Em resumo, os efeitos do PTH na remodelação óssea são dependentes do modo de administração e da dose (Aslan *et al.*, 2012).

2 Revisão da Literatura

2.1 PTH - Fisiológico

O PTH é secretado pelas células principais das glândulas paratireóides como um polipeptídeo contendo 84 aminoácidos. Atua aumentando a concentração de cálcio (Ca^{2+}) no sangue, enquanto que a calcitonina, um hormônio produzido pelas células parafoliculares (células C) da glândula tireóide, atua de modo a diminuir a concentração de cálcio. PTH aumenta a concentração de cálcio no sangue, agindo sobre o receptor do hormônio da paratiróide 1 (relacionado a níveis elevados de cálcio nos ossos e rins) e do receptor do hormônio da paratiróide 2 (níveis elevados no sistema nervoso central, no pâncreas, testículos e placenta). A meia vida plasmática do PTH é de cerca de 4 minutos (Bieglmayer *et al.*, 2002).

A função geral do PTH endógeno é manter os níveis extracelulares normais de cálcio por aumentar a absorção gastrointestinal deste íon, a reabsorção nos rins de cálcio e fosfato e a reabsorção óssea osteoclástica, levando a liberação de cálcio do esqueleto (Quattrochi & Kourlas, 2004).

O PTH regula o cálcio sérico através dos seus efeitos sobre alguns tecidos (Coetzee *et al.*, 2004). No tecido ósseo, aumenta a liberação de cálcio a partir do grande reservatório contido nos ossos. A reabsorção óssea é a destruição normal do osso pelos osteoclastos, os quais são indiretamente estimulados pelo PTH. A estimulação é indireta, pois os osteoclastos não possuem um receptor para o PTH, sendo assim, o PTH se liga aos osteoblastos, células responsáveis pela formação de tecido ósseo. Esta ligação estimula os osteoblastos a aumentar a sua expressão de RANKL (receptor ativador do fator nuclear κB ligante) e inibe a expressão de osteoprotegerina (OPG). A OPG se liga a RANKL e bloqueia sua interação com receptor RANK. A ligação do RANKL ao RANK, facilitada pela redução da quantidade de OPG, estimula estes precursores de osteoclastos a se unirem, formando novos osteoclastos, o que, em última análise aumenta a reabsorção óssea (Poole & Reeve, 2005; Lee & Partridge, 2009).

No rim, o PTH aumenta a reabsorção ativa de cálcio e magnésio nos túbulos distais e no espesso ramo ascendente. Como o osso é degradado, ambos, cálcio e fosfato são liberados. Ele também diminui a reabsorção de fosfato, com uma perda líquida na sua concentração plasmática. Há um aumento proporcional de fosfato, mas o cálcio está livre na circulação (Poole *et al.* 2005; Lee *et al.* 2009). No intestino, o PTH aumenta a absorção de cálcio através do aumento da produção da vitamina D ativada. A ativação da vitamina D ocorre no rim e esta forma ativa aumenta a absorção de cálcio pela via calbindina no intestino (Coetzee *et al.*, 2004).

2.2 PTH - Anabólico

O PTH funciona como um mediador importante na remodelação óssea e um regulador essencial da homeostase do cálcio. Além dos efeitos catabólicos já bem estabelecidos do PTH, mais recentemente foi reconhecido que sua administração intermitente tem efeitos anabólicos, promovendo a formação de tecido ósseo (Liu *et al.*, 2009).

O efeito anabólico do PTH tem sido de considerável interesse nos últimos anos. A administração intermitente de PTH mostrou aumentar a densidade mineral óssea em mulheres com osteoporose (Neer *et al.*, 2001) e em ratos ovariectomizados (Andersson *et al.*, 2001), a resistência de ossos longos a fratura (Komrakova *et al.*, 2010) e acelerar o reparo de fraturas ósseas (Nakajima *et al.*, 2002). Estudos investigando o efeito de aplicações intermitentes de PTH na mandíbula mostraram que o PTH estimulou a formação óssea em mandíbulas de ratos idosos e ovariectomizados (Miller *et al.*, 1997), e foi capaz de inibir perda óssea em ratos com periodontite experimentalmente induzida, mesmo quando a periodontite foi induzida em ratas osteoporóticas (Barros *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005). Devido ao comprovado efeito anabólico do PTH no auxílio ao tratamento da osteoporose (Neer *et al.*, 2001), atualmente é a única droga anabólica óssea permitida para uso em humanos (Food And Drug Administration - FDA, 2000).

Este hormônio tem recebido muita atenção nos últimos anos, devido à constatação de que o tratamento intermitente (injeção diária) causa um aumento significativo na massa óssea (Compston, 2005; Hodsman *et al.*, 2005; Rubin & Bilezikian, 2005). A forma intacta do hormônio PTH (1-84) e o seu fragmento N-terminal (1-34) tem sido desenvolvidos para o tratamento da osteoporose já estabelecida. No entanto, apesar do PTH ser um agente bem reconhecido na formação óssea, os mecanismos celulares continuam sendo largamente estudados (Qin *et al.*, 2004; Jilka, 2007).

O PTH pode gerar tanto efeitos anabólicos, como catabólicos sobre a massa e a densidade óssea. A aplicação intermitente aumenta a massa óssea, aumentando predominantemente a formação de osso, ao passo que o tratamento contínuo estimula uma alta remodelação óssea pelos osteoclastos e osteoblastos, resultando em perda óssea (Qin *et al.*, 2004; Poole & Reeve, 2005; Jilka, 2007). O PTH promove sua ação ao se ligar ao receptor de PTH relacionado ao peptídeo tipo 1 (PTH1R), que é o receptor acoplado à proteína G (Luck *et al.*, 1999; Grauschoff *et al.*, 2000). O AMP cíclico (cAMP) tem sido implicado como a principal via de sinalização pela qual as respostas anabólicas do PTH são efetuadas (Civitelli *et al.*, 1990).

O receptor PTH1R é expresso em células da linhagem osteoblástica, em células da medula óssea, linfócitos e outros tipos de células, indicando uma complexa rede regulatória que envolve vários tipos de células e interações moleculares (Grauschoff *et al.*, 2000). A ação anabólica do PTH no osso é atribuída à sua capacidade de aumentar o número de osteoblastos, por promover a proliferação de precursores osteoblásticos (Pettway *et al.*, 2008), a sobrevivência de osteoblastos, e, possivelmente, a reativação de células de revestimento ósseos quiescentes, as quais são de origem osteoblástica (Qin *et al.*, 2004; Poole & Reeve, 2005; Jilka, 2007).

Ao longo dos últimos anos, várias moléculas têm sido identificadas como importantes reguladoras dos efeitos ósseos mediados pelo PTH com base em abordagens genéticas em ratos, e a lista de novos efetores de PTH é cada vez maior (Kramer *et al.*, 2010; Bellido *et al.*, 2012). Alguns trabalhos têm mostrado

um papel crítico da via de sinalização Wnt no efeito anabólico induzido pelo PTH (Bodine *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2010). A via de sinalização Wnt, assim como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são críticas para a osteoblastogênese, porque elas fornecem o estímulo inicial para o comprometimento de progenitores mesenquimais em direção à linhagem osteoblástica. A expressão do gene *Sost* resulta na produção da proteína esclerostina pelos osteócitos e esta proteína é um potente antagonista de BMPs e da via de sinalização Wnt. PTH parece reduzir a expressão de *Sost* em osteócitos, e estimular desta forma os efeitos pro-osteoblastogênicos (Bellido *et al.*, 2005).

O fator de crescimento tipo insulina (IGF) parece ser também requerido para o efeito anabólico do PTH na formação óssea. Um estudo mostrou que um anticorpo neutralizante de IGF-1 bloqueou os efeitos do PTH na síntese de colágeno em calvária de fetos de ratos cultivada e implicou IGF-1 como um mediador dos efeitos do PTH em osteoblastos (Canalis *et al.*, 1989). Em adição, camundongos knockout para IGF-1 falham em mostrar aumentada formação óssea em resposta ao PTH (Miyakoshi *et al.*, 2001).

O aumento induzido por PTH na formação óssea é também parcialmente relacionado com a reabsorção óssea osteoclástica (Martin & Sims, 2005; Li *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2007b). Apesar de sua ação anabólica óssea, a administração intermitente de PTH resulta, ao longo do tempo, em aumento da reabsorção óssea, refletida nos humanos pelo seu aumento no sangue e nos biomarcadores ósseos urinários (Dobnig *et al.*, 2005; McClung *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006). O aparecimento de elevada reabsorção óssea induzida por PTH e, conseqüentemente o turnover ósseo, não está apenas ligado à duração da exposição ao PTH, mas também ao aumento proporcional do hormônio através das doses aplicadas. As fases iniciais de anabolismo ósseo induzido por PTH são marcadas pela ativação de células quiescentes da superfície óssea, o que resulta na expansão relativa da superfície óssea, enquanto que eventos posteriores dependem mais da frequência da estimulação das unidades de remodelamento ósseo existentes (Hodsman *et al.*, 2005; Martin & Sims, 2005).

O tratamento contínuo com PTH para manter níveis elevados do hormônio aumenta o número e a atividade dos osteoclastos, causando uma maior remodelação óssea e, conseqüentemente, perda óssea. Este efeito é indiretamente mediado por células da medula óssea e células da linhagem osteoblástica. Todas estas células expressam PTH1R e respondem à estimulação por PTH com mudanças na expressão de citocina e fator de crescimento, as quais afetam a reabsorção óssea pelos osteoclastos e de suas células precursoras. Portanto, o tratamento contínuo com PTH resulta na ativação de vários genes envolvidos na reabsorção óssea (Qin *et al.*, 2004; Poole & Reeve, 2005).

Ele eleva a expressão do fator de necrose tumoral (TNF), um membro da família ligado ao RANKL, enquanto que a expressão do receptor RANKL osteoprotegerina (OPG) não é alterado no esqueleto em ratos em crescimento (Li *et al.*, 2007a), mas é regulado positivamente em ratos com esqueleto maduro (Onyia *et al.*, 2005). Juntas, essas mudanças revelam o persistente aumento da relação RANKL / OPG, interação que favorece a sinalização de RANKL ao seu receptor RANK, que é expresso em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros, conduzindo assim a maior osteoclastogênese e reabsorção óssea. Curiosamente, o tratamento intermitente com PTH também provoca um aumento transitório na expressão de RANKL, que é seguido de um aumento na expressão de OPG, permitindo assim um breve estímulo transitório da atividade dos osteoclastos (Li *et al.*, 2007b). Devido à ligação da atividade entre osteoclastos e dos osteoblastos, é considerado um aumento temporário da ação dos osteoclastos para desencadear a ativação dos osteoblastos, portanto contribuindo para a bem conhecida capacidade de PTH ativar remodelação esquelética (Kramer *et al.*, 2010; Bellido *et al.*, 2012).

Em resumo, os resultados positivos ou negativos da administração de PTH sobre o tecido ósseo dependem da forma de exposição, da duração do tratamento e da dose aplicada de PTH. Todos estes fatores afetam a relativa capacidade e intensidade do PTH ativar a modelagem esquelética em relação à remodelação, e a formação óssea osteoblástica à reabsorção óssea osteoclástica. Apenas nas

situações em que a formação excede à reabsorção óssea, pode-se alcançar um ganho real de tecido ósseo (Kramer *et al.*, 2010).

2.3 Irradiação e PTH

A radioterapia é muitas vezes um tratamento útil para vários tipos de carcinomas, em combinação com o tratamento cirúrgico. (Yao & Terris, 1999) No entanto, os tecidos intactos dentro do campo da radiação podem sofrer danos irreversíveis dependendo da quantidade de irradiação ionizante utilizada. As sequelas da radioterapia surgem de lesões agudas que resultam na morte de células de divisão rápida e de injúrias crônicas que são causadas nas células parenquimatosas de divisão lenta e na microvascularização (Marx, 1983). Os efeitos da radiação necrosante no tecido ósseo são conhecidos como osteorradionecrose. Esta é uma das complicações mais graves e imprevisíveis da irradiação para tratamento de câncer de cabeça e pescoço. A maioria dos problemas ósseos aparece nos primeiros 3-12 meses após a irradiação, mas, após este período, o risco ainda permanece por muitos anos, especialmente se o paciente for submetido à extração dentária em algum momento no futuro (Million *et al.*, 1989; Yao & Terris, 1999; Silverman, 1999).

A medula óssea humana contém células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e os compartimentos de células estromais, estas últimas compreendem vários tipos de células, incluindo as células-tronco mesenquimais (CTMs) (Prockop, 1997; Gerson, 1999). As células mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea de adultos são pluripotentes e podem diferenciar-se em coração, pulmão, intestino e epitélio do animal (Jiang *et al.*, 2002; Kawada *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). O repovoamento com MSCs derivadas da medula óssea pode levar a diferenciação em tipos celulares diferentes, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos e fibroblastos (Prockop, 1997). O microambiente da medula óssea é compreendido pelo nicho vascular e o nicho de células do estroma, incluindo osteoblastos para a auto renovação e diferenciação das células tronco (Yin & Li, 2006; Garrett & Emerson, 2009). A medula óssea é extremamente vulnerável a citotoxicidade

causada por terapia com radiação (Mauch *et al.*, 1995). Em contraste com as HSCs, poucos dados foram publicados sobre a radiosensibilidade de CTMs.

Vários estudos recentes relataram que as MSCs exibem o perfil completo do seu hospedeiro após irradiação de corpo todo e transplante de medula óssea, enquanto que células diferenciadas a partir de HSCs são originadas pelo doador (Dickhut *et al.*, 2005; Rieger *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos moleculares e celulares que representam tal tolerância em MSCs são ainda elusivos. A irradiação gera radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os quais causam danos a alvos celulares vitais, como no DNA e nas membranas, e afetam os nichos de células tronco (Greenberger & Epperly, 2009). Ambos, HSCs e MSCs, estão implicados na reparação de danos promovidos pela irradiação aos tecidos epiteliais distantes através da sua mobilização pela circulação (Epperly *et al.*, 2004; Greenberger & Epperly, 2007; Krause *et al.*, 2001).

A cerca de cinquenta anos atrás o PTH em uma injeção do velho extrato de paratireóide bovina de Lilly (PTE) foi encontrado para aumentar a sobrevivência, por até 30 dias, de ratos submetidos a várias exposições a irradiação por raios-X, quando administrado a partir de 18 horas antes até 3h após a irradiação. Esta foi a primeira indicação de que o PTH poderia estimular a hematopoiese (Rixon *et al.*, 1958; Rixon & Whitfield, 1961). A relação entre o PTH e a hematopoiese foi confirmada, ao mostrar que hPTH-(1-34) OH aumenta o tamanho do *pool* de células tronco hematopoiéticas em camundongos. O peptídeo opera através de uma explosão de AMP cíclico mediada por Jagged 1 na produção de células osteoblásticas de revestimentos e nos nichos de células tronco nas superfícies ósseas trabeculares. O Jagged 1 das células osteoblásticas aumenta o *pool* de células-tronco hematopoéticas, ativando receptores Notch ligados as células-tronco. A sinalização de AMP cíclico provocada pelo PTH, também pode estimular diretamente a proliferação das células tronco hematopoiéticas. (Calvi *et al.*, 2003).

No entanto, a injeção única de PTH em experiências iniciais utilizando PTE provavelmente aumentou a sobrevivência de ratos irradiados principalmente evitando o início da apoptose celular durante as primeiras 5 horas após a

irradiação e danos irreversíveis aos progenitores hematopoiéticos (Vavrova *et al.*, 2002; Bertho *et al.*, 2004).

Também foi demonstrado que injeções diárias de hPTH (1-34) OH permitiria a sobrevivência de camundongos, letalmente irradiados, por estimular o crescimento de células normais transplantadas da medula óssea. (Calvi *et al.*, 2003).

Atualmente o PTH é o único agente anabólico liberado pela FDA para o tratamento da osteoporose, baseando-se em estudos que demonstraram sua ação benéfica no tratamento desta patologia (Neer *et al.*, 2001). O PTH também tem a função de conduzir a hematopoiese com potencial de se tornar uma ferramenta importante na redução do dano infligido na medula óssea por drogas citotóxicas, quimioterápicos e irradiação ionizante utilizados nos tratamento contra o câncer. (Whitfield, 2005). Recentes estudos relatam e reforçam os benefícios na administração de PTH pós irradiação (Arrington *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2011), justificando as hipóteses anteriormente abordadas por outros autores.

3 Proposição

O presente estudo visou avaliar a qualidade óssea após a administração intermitente de PTH em ratos submetidos à irradiação prévia de corpo inteiro. Para atingir este propósito, foi realizada análise morfológica, morfométrica, ensaios mecânicos e microtomografia computadorizada.

4 Material e Métodos

4.1 Experimento

Após a aprovação no comitê de ética (CEEa – Unicamp, protocolo nº 2788-1), 27 ratos (Wistar) de aproximadamente 350 gramas foram distribuídos em 3 grupos de 9 animais cada. Todos os ratos foram anestesiados com Ketamina-25mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e Xilazina-10mg/kg (Mebay Corp., Shawnee, KS) e apenas 18 foram irradiados. A dose única de irradiação foi de 8 Gy- 0,75Gy/min (Hosokawa Y *et al.*, 2007; Hosokawa Y *et al.*, 2010), sendo realizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) - Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia. Após cerca de 1h do procedimento de irradiação, foi iniciada a administração (subcutânea) intermitente (dia sim/dia não) de PTH por 24 dias (12 aplicações).

Os animais foram divididos em 3 grupos:

1. Controle (CONT): administrado veículo (0,08 mL de ácido acético a 0,01%)
2. Irradiado (RAD): administrado veículo (0,08 mL de ácido acético a 0,01%)
3. Irradiado + PTH (RAD+PTH): 0,08 mL de hPTH(1-34) (40ug/Kg) em ácido acético a 0,015%.

4.1.1Processamento Histológico

Após o período de 24 dias pós-irradiação, os animais foram sacrificados, a tíbia e hemimandíbula direita congeladas para posterior pesagem e análise de parâmetros referentes à qualidade óssea através de microtomografia computadorizada (uCT) (Bouxsein *et al.*, 2010), enquanto que a tíbia e hemimandíbula esquerda foram fixadas em solução de Karnovsk, descalcificadas em EDTA 4,13%. A hemimandíbula foi seccionada entre o 1º e 2º molar para posterior inclusão em parafina (Paraplast). Em um bloco foi realizada a inclusão do 2º molar no sentido mesio-distal para análise da cortical óssea lingual. Neste mesmo bloco foi incluída a tíbia, a qual foi reduzida, medindo 1cm da região da

epífise superior em direção a diáfise. Foram realizados cortes semi seriados de 6µm, aderidos às lâminas de vidro e corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). Estes cortes corados com H&E foram utilizados para análise morfométrica (Fig. 1A e 1C).

Também foi feita a inclusão do primeiro molar esquerdo no sentido vestibulo-lingual para realizar a análise da região de furca, entre as raízes medianas. Foram realizados cortes semi seriados de 6µm. Alguns cortes aderidos às lâminas de vidro referentes à região de furca foram corados em H&E (Fig. 1B), enquanto em outros para a evidenciação de osteoclastos foi utilizada a reação histoquímica da fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP (Fig. 1D) (Feitosa *et al.*, 2009).

Os fêmures foram congelados a - 20°C para realização dos ensaios mecânicos de flexão, compressão e microdureza Knoop.

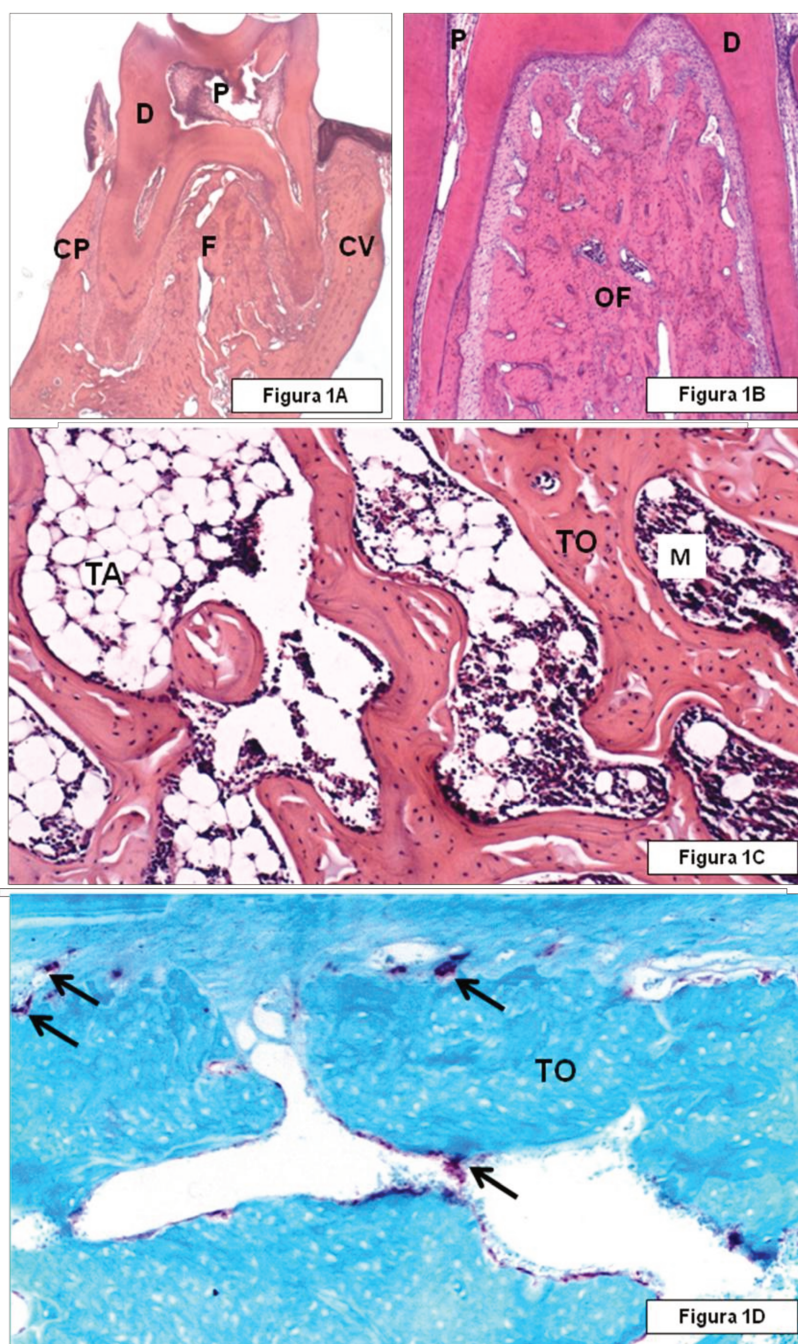


Fig. 1: Fotomicrografias dos cortes das regiões utilizadas para análises morfométricas. **Fig. 1A** – corte histológico do 2º molar, furca(F), dentina (D), polpa (P), cortical lingual (CP) e cortical vestibular (CV). H&E 25X. **Fig. 1B** – região de furca do 1º molar, dentina (D), polpa (P) e tecido ósseo da furca (OF). H&E 50x. **Fig. 1C** – região de epífise da tíbia (parte superior), tecido ósseo (TO), tecido adiposo (TA), tecido medular (M). H&E 100X. **Fig. 1D** – região de furca do 1º molar, tecido ósseo (TO), osteoclastos (setas). TRAP 100X.

4.2 Forma de Análise

4.2.1 Análise morfométrica – H&E

As imagens foram capturadas e através do software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetic Inc, USA) (Viola et al., 2012) foi aplicada uma malha quadriculada de $236.800 \mu\text{m}^2$ na região da cortical lingual do 2º molar. Através da marcação das intersecções dos quadrantes na máscara foi quantificada a área óssea desta região utilizando 2 cortes por animal por grupo.

Nos cortes referentes à tibia, foi aplicada uma malha de $814.050 \mu\text{m}^2$, para quantificar a área de tecido ósseo marcando as intersecções dos quadrantes na máscara e o número de osteócitos/ μm^2 . Foram utilizados 3 cortes por animal por grupo. Nestes cortes também foi realizada uma análise histológica qualitativa da presença de tecido adiposo na região medular.

Uma malha $2.219.200 \mu\text{m}^2$ foi aplicada na região de furca dos cortes relacionados ao 1º molar, sendo dois cortes por animal de cada grupo, para quantificar a área óssea desta região através das intersecções dos quadrantes na máscara utilizada.

4.2.2 Análise morfométrica – TRAP

Para realização deste método foram selecionados cortes semi seriados da região de furca do 1º molar adjacentes àqueles corados com HE. Inicialmente foi preparada uma solução de 4 mg de naphtol AS-BI phosphate substrate (Sigma-aldrich, USA) em 0,25 mL de N,N dimetil formamida, e em seguida foram adicionados 25 mL de tampão acetato 0,2 M (pH 5,0), 35 mg de Fast RED Violet LB (Sigma-aldrich, USA) e 60 μL de MgCl a 10%. Logo após, a solução foi filtrada, aquecida a 37°C e 50 mM de L(+) ácido tartárico (Sigma-aldrich, USA) foi adicionado. As lâminas contendo os cortes foram incubadas por 90 minutos a 37°C . Após a incubação, as lâminas foram lavadas por 30 minutos em água corrente, contracoradas com Fast Green por 1 minuto e montadas com lamínulas utilizando Entellan® (Merck). Nestes cortes da região de furca submetidos à reação TRAP foi feita uma análise quantitativa de osteoclastos/ μm^2 , considerando apenas as marcações de células com dois ou mais núcleos verificadas através da ampliação (Zoom) das imagens no programa Image Pro Plus.

4.2.3 Ensaios mecânicos

Através da máquina de teste de materiais universal Instron, a qual avalia propriedades mecânicas dos materiais, foram realizados os ensaios mecânicos:

- Resistência à compressão: resultado da aplicação de uma força de compressão a um material, resultando em uma redução em seu volume, ocorre quando a força axial (Newton) aplicada estiver atuando com o sentido dirigido para o interior da peça.

O fêmur esquerdo foi posicionado no sentido vertical, sendo a porção inferior apoiada ao suporte de metal com cera utilidade, com célula de carga de 5000N, sendo feito o calculo a partir do momento em que ela toca o fêmur com uma força de 5N (Fig. 2a).

- Resistência à flexão em três pontos: utiliza uma barra bi apoiada com aplicação de carga no centro da distância entre os apoios, ou seja, existe três pontos de carga (Newton).

O fêmur direito foi posicionado horizontalmente na barra, com uma distância de 20mm entre os apoios (Fig.2b), sendo obtido um gráfico referente a cada peça analisada.

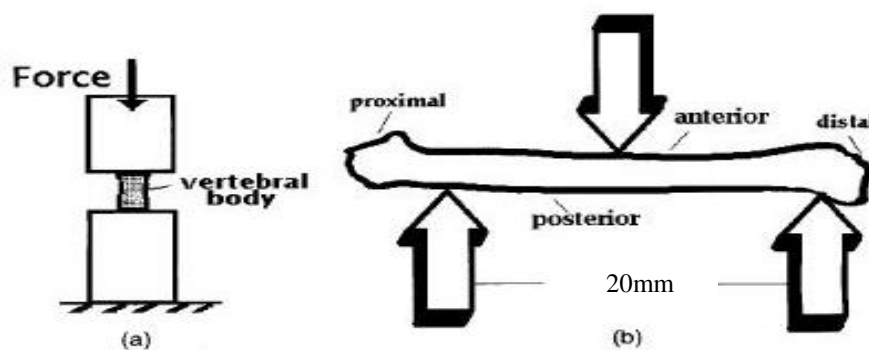


Fig. 2: Esquema dos ensaios mecânicos. (a)compressão; (b) flexão em três pontos. Fonte: Rossi *et al.*, 2010.

No ensaio de microdureza Knoop foram utilizados os fragmentos inferiores do fêmur direito utilizados no ensaio de flexão. O fragmento foi reduzido, medindo 1 cm a partir da epífise femural em direção ao centro. A região da epífise também foi seccionada em 0,5cm para tornar a região plana para ser apoiada na máquina. A secção foi feita com disco de aço e para remoção das

irregularidades foram lixadas (Lixa 1200) as extremidades da peça por 5 segundos na lixadeira com hidratação constante (Politris) para promover um melhor polimento da superfície, posteriormente foi feita uma lavagem rápida em água corrente.

O número de dureza Knoop (KHN) obtido é a razão entre a carga aplicada no edentador P (kgf) (100g de força) e a área projetada não recuperada A (mm²). O edentador Knoop é um diamante em forma piramidal que produz uma endentação em forma de pirâmide. Para a determinação da dureza Knoop, somente a diagonal maior da endentação é medida e usada para o cálculo da KHN (Fig. 3).

Foram realizadas 3 edentações, a primeira na região central da peça e as demais, 0,5mm para direita e 0,5mm para esquerda partindo da edentação central.

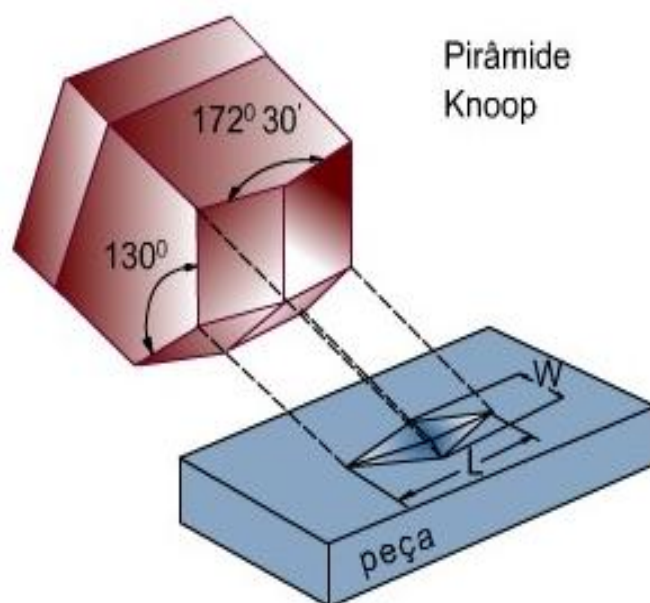


Fig.3: Edentador Knoop piramidal.

Fonte:http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6560-teste-da-microdureza#.URL6jB2M53E

Após a obtenção de todos os dados das análises realizadas, estes foram submetidos à análise estatística (Anova e Teste de Tukey).

4.2.4 Microtomografia computadorizada

A tíbia e hemimandíbula direita foram escaneadas no microtomógrafo SkyScan 1176 da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, posteriormente, foi realizada a reconstrução das peças no programa NRecon. Após a reconstrução, através do programa CTanalyser, foi selecionada a região de interesse em cada peça (Fig. 4) e realizada a análise das propriedades do tecido ósseo (Fig. 5).

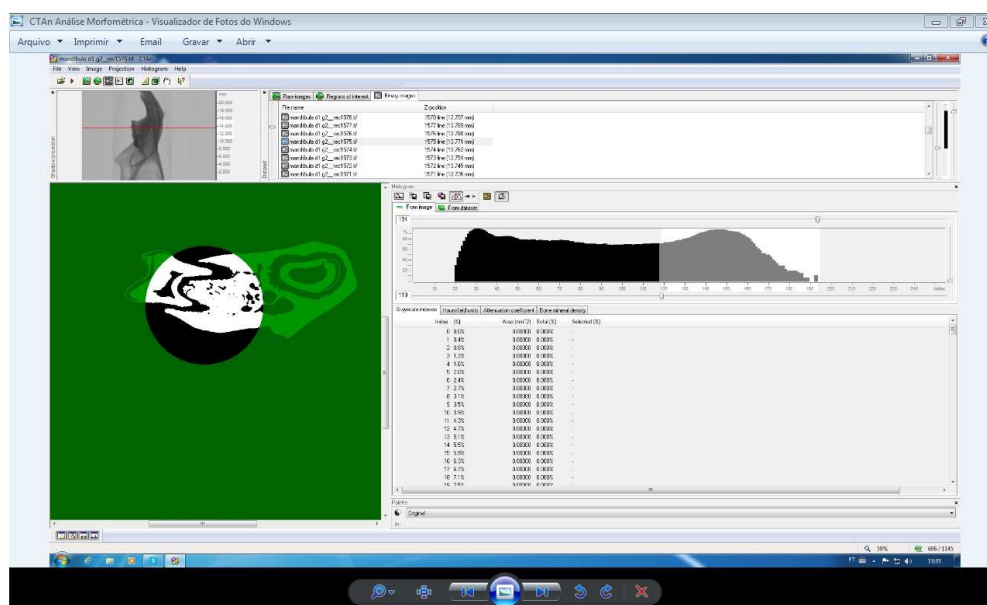


Fig. 4: Seleção da região a ser analisada através do programa CTanalyser.

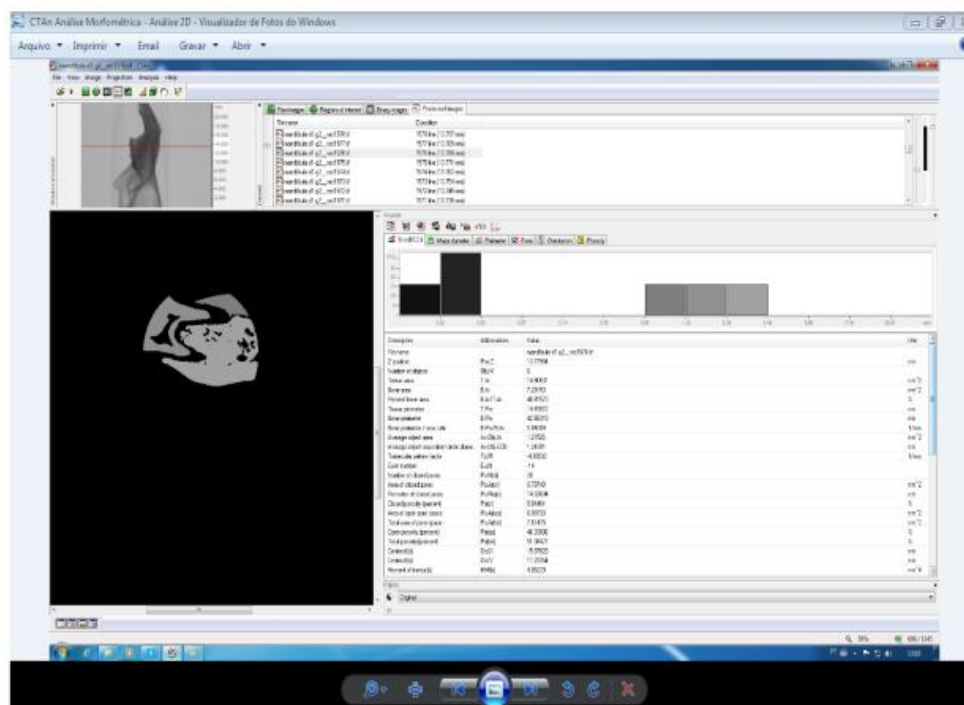


Fig. 5: Análise de algumas propriedades ósseas das peças através do programa CTanalyser.

Nas mandíbulas foram analisados 604 slices (reconstruções analisadas - Volume de Interesse/VOI) e a Região de Interesse/ ROI foi uma esfera de 3mm de raio localizada nos molares (Fig. 1). Nas tíbias foram analisados 601 slices (VOI).

Após a obtenção de todos os dados referentes às propriedades ósseas, alguns destes valores (volume ósseo, densidade da superfície óssea e espessura das trabéculas) foram submetidos à análise estatística (ANOVA).

5 Resultados

Durante os 24 dias de administração intermitente de PTH (pós-irradiação), foi verificada uma queda acentuada (morte) de animais do Grupo RAD + PTH. Todos os animais deste grupo apresentavam-se muito debilitados no decorrer do tratamento com PTH. Aos 12 dias de tratamento ocorreu a morte do primeiro animal, seguida por mais uma morte aos 14 dias, duas aos 18 dias, uma aos 20 e a última aos 24 dias de tratamento com PTH.

Dois animais, sendo um do Grupo CONT e o outro do RAD, morreram durante o procedimento de anestesia previamente a irradiação. Finalizando o experimento com:

- Grupo RAD+PTH: 3 animais
- Grupo RAD: 8 animais
- Grupo CONT: 8 animais

Todos os animais do Grupo RAD+PTH apresentavam as mesmas características: apatia (ficavam quietos, sonolentos em um canto da gaiola), pálidos, olhos esbranquiçados, pelo eriçado e musculatura contraída, nariz com pequenos pontos de sangramento, não comiam e nem bebiam água, além de apresentarem um odor característico de infecção.

Em relação às médias dos pesos dos animais, os valores obtidos durante a pesagem no início do tratamento com PTH foram: Grupo CONT - 432g (9 animais), Grupo RAD - 408g (9 animais), Grupo RAD+PTH - 415g (9 animais). Valores da pesagem no meio do tratamento com PTH: Grupo CONT - 438g (8 animais), Grupo RAD - 361g (8 animais), Grupo RAD+PTH - 392g (9 animais). E os valores ao final do experimento, antes de realizar o sacrifício dos animais foram: Grupo CONT - 490g (8 animais), Grupo RAD - 411g (8 animais), Grupo RAD+PTH - 473g (3 animais) (Fig. 6).

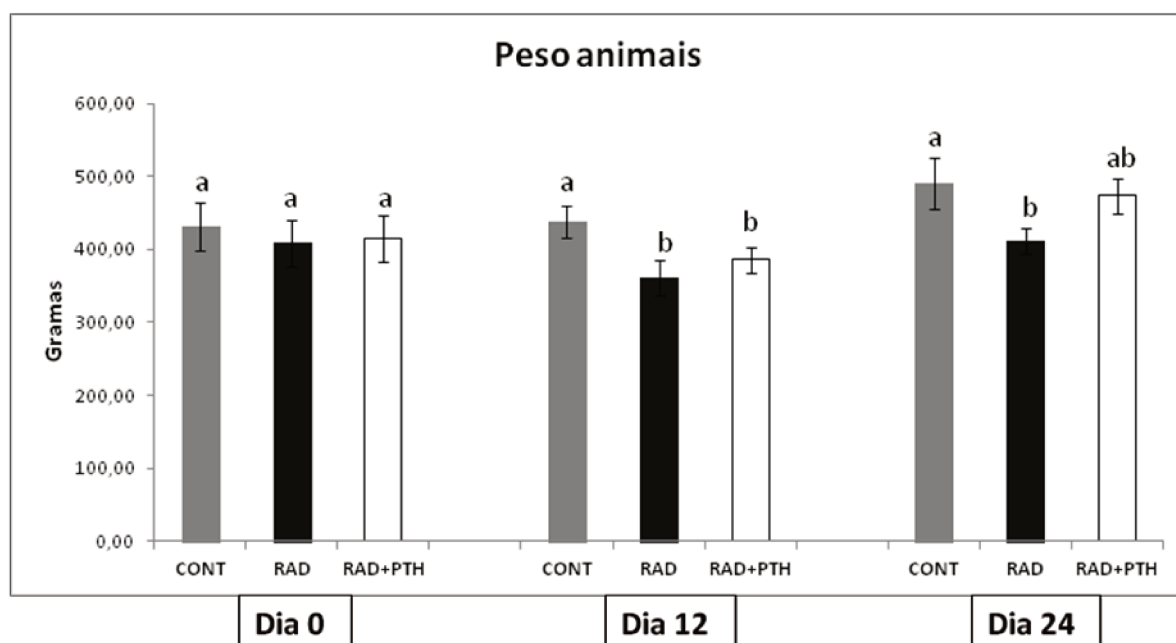


Fig. 6: Gráfico representativo das médias $\pm$ do peso dos animais durante o experimento ($p < 0,05$).

Nas análises morfométricas dos cortes em H&E, foi possível verificar a presença de alterações significativas nos grupos irradiados em comparação ao Grupo CONT, através da análise da área da cortical óssea lingual do 2º molar (Fig.7), a qual se apresentou maior no Grupo CONT (Fig.8). O Grupo CONT em comparação ao Grupo RAD apresentou maior área óssea e número de osteoclastos na região de furca do 1º molar respectivamente (Fig. 9,10,11,12), além de maior área óssea na tibia (Fig. 13).

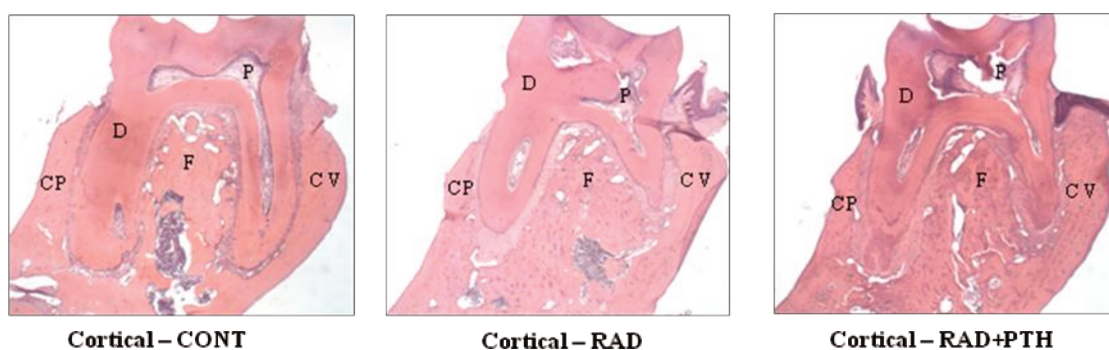


Fig. 7: Fotomicrografias obtidas dos três diferentes grupos dos cortes da cortical palatina do 2º molar, furca(F), dentina (D), polpa (P), cortical palatina (CP) e cortical vestibular (CV). H&E 25X.

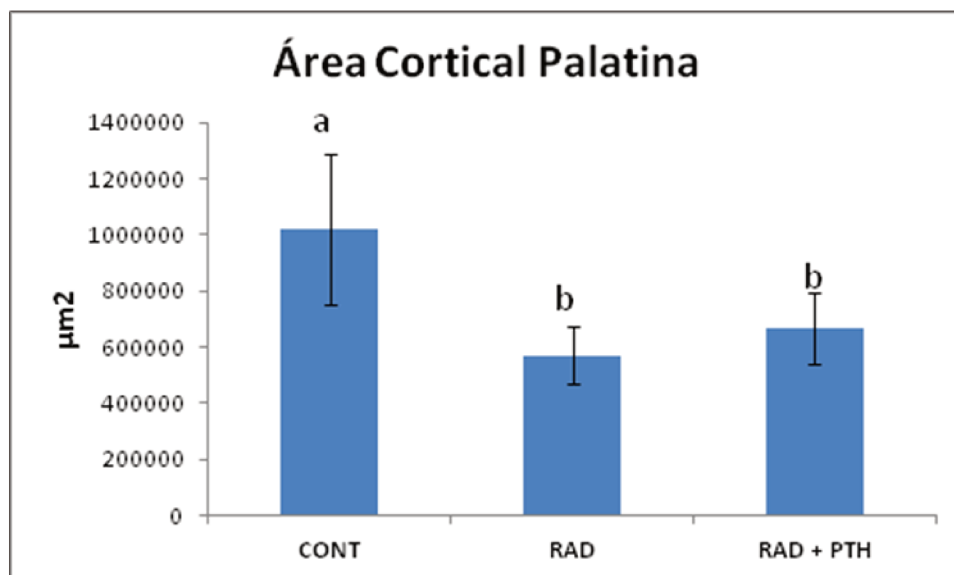


Fig. 8: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão da área óssea da área da cortical lingual do 2º molar ($p < 0,01$).

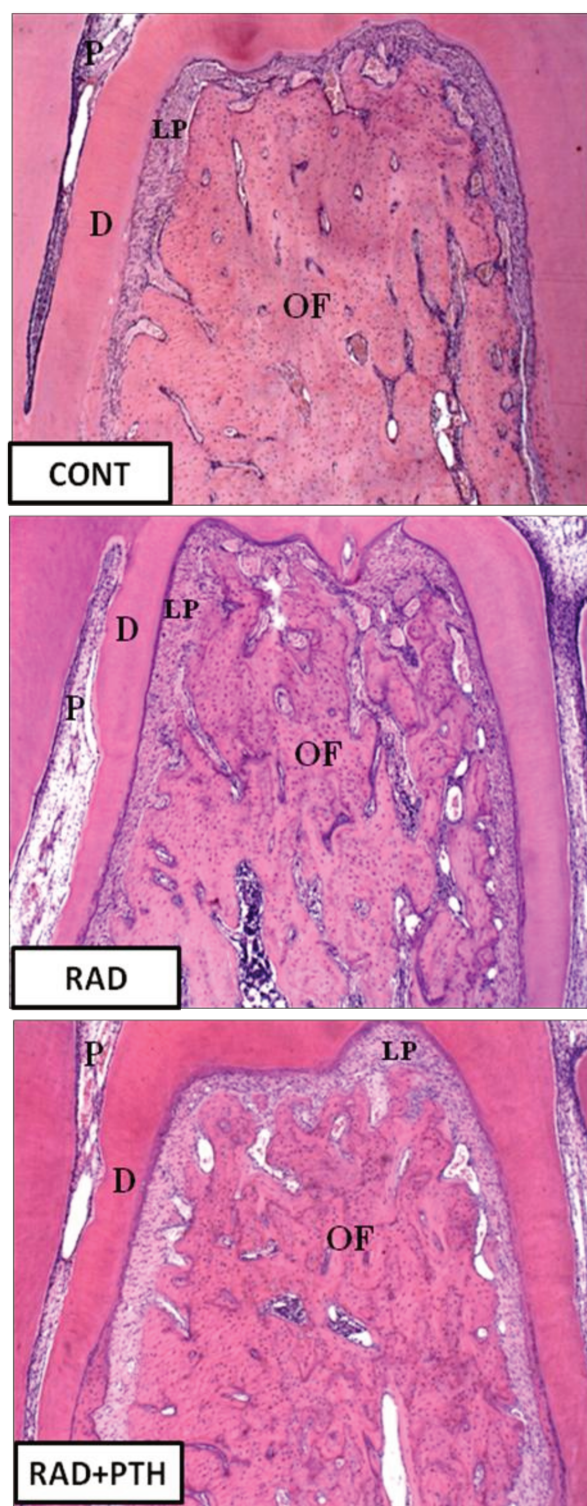


Fig. 9: Fotomicrografias obtidas dos três diferentes grupos dos cortes da região de furca do 1º molar. Dentina (D), polpa (P) e tecido ósseo da furca (OF), ligamento periodontal (LP). H&E 50x.

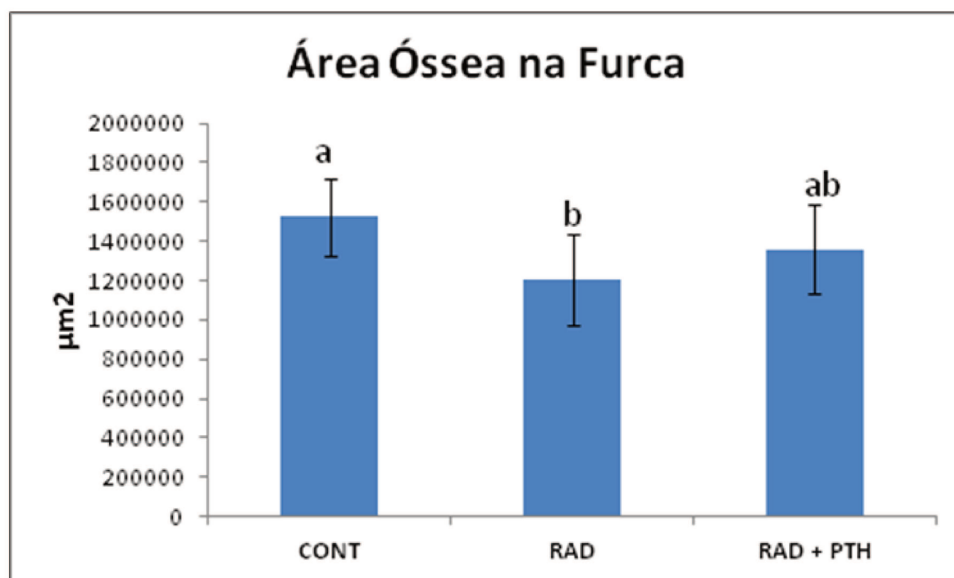


Fig. 10: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão da área óssea na região de furca do 1º molar ($p < 0,05$).

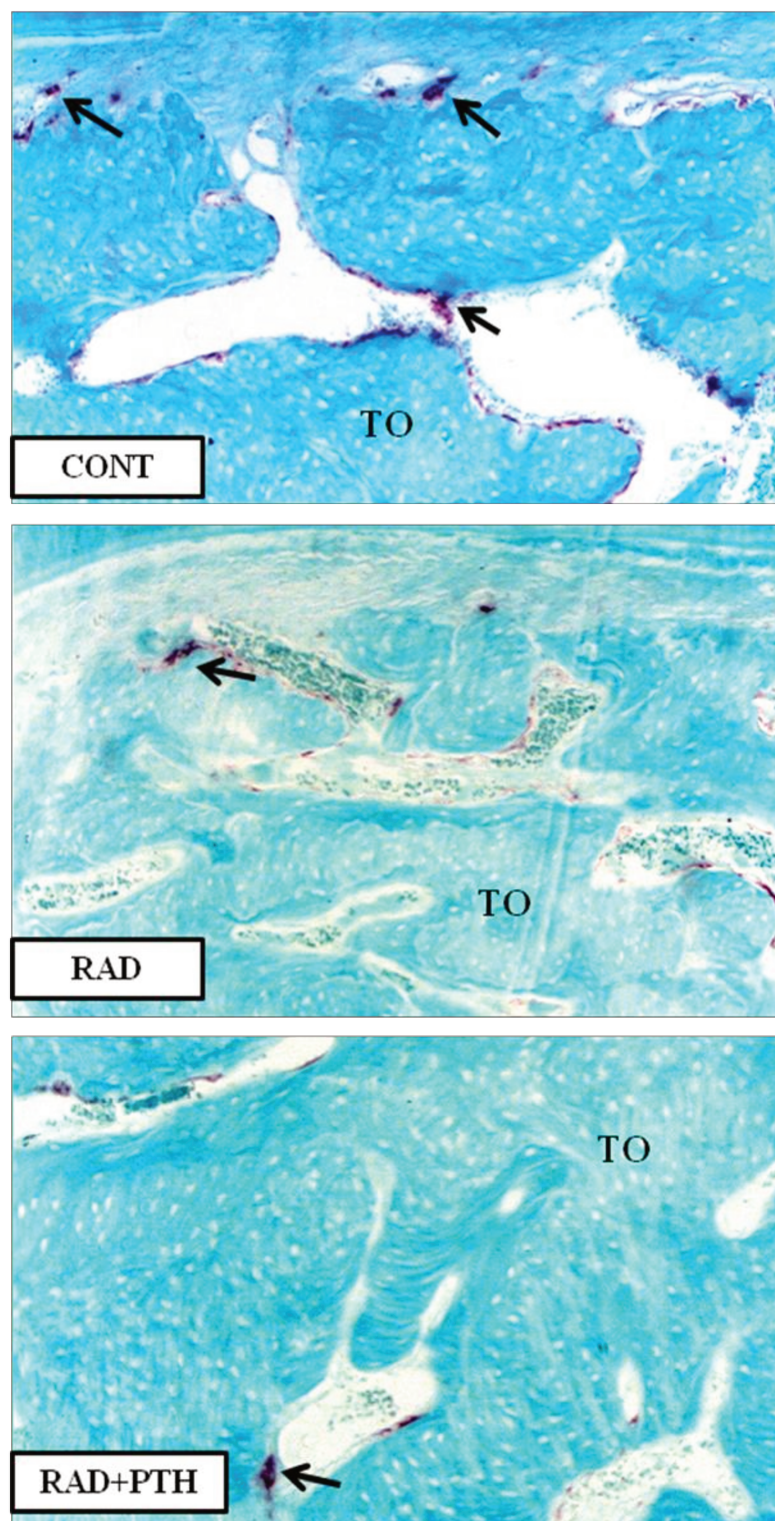


Fig. 11: Fotomicrografias obtidas dos três diferentes grupos dos cortes da região de furca do 1º molar, tecido ósseo (TO), osteoclastos (setas). TRAP 100X.

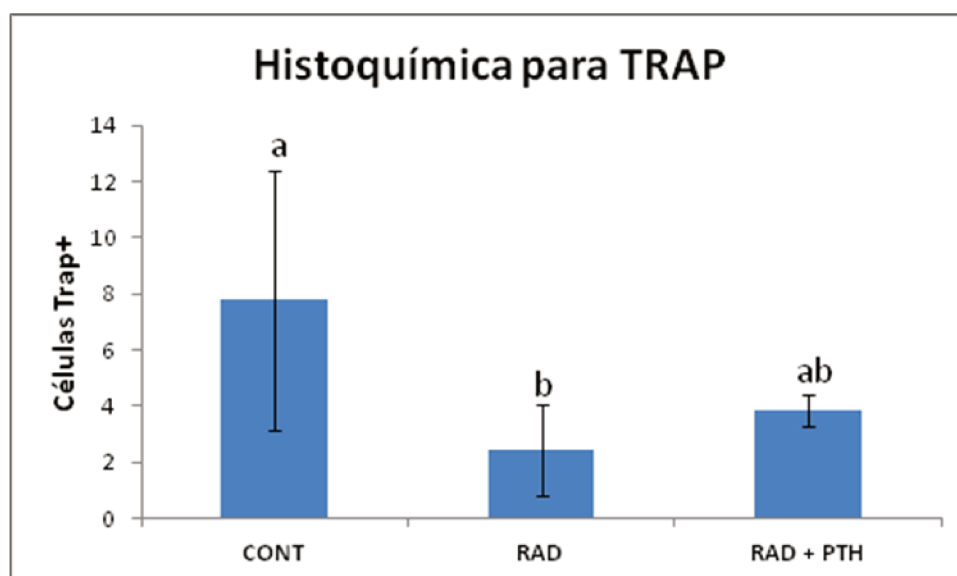


Fig. 12: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão da contagem de osteoclastos/ μm^2 (TRAP) na região de furca do 1º molar ($p < 0,01$).

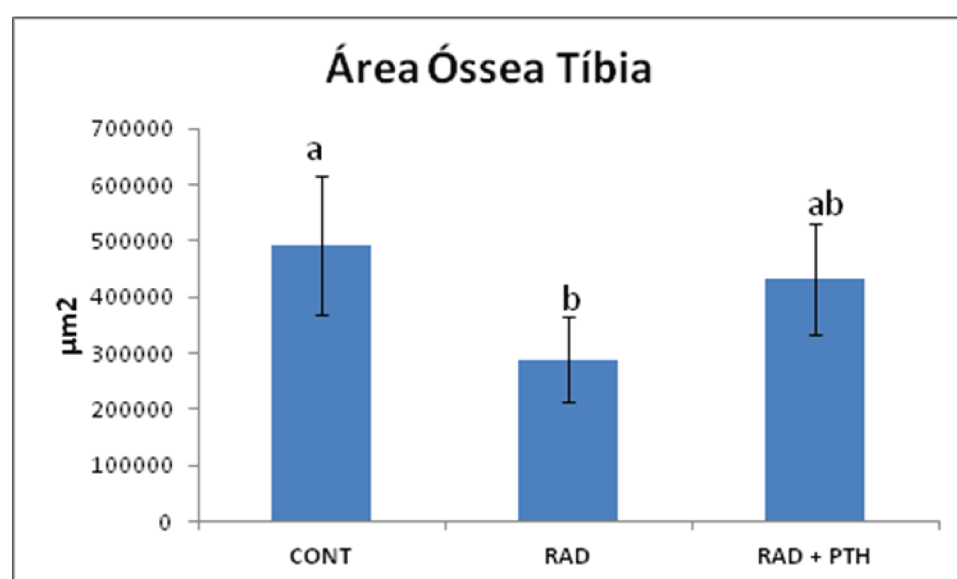


Fig. 13: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão da área óssea nos cortes da tíbia ($p < 0,05$).

Não houve diferenças significantes na contagem de osteócitos na tíbia entre os diferentes grupos (Fig. 14), assim como não houve diferenças entre a área óssea da tíbia do Grupo CONT e Grupo RAD+PTH (Fig.13). Entretanto, em uma análise histológica qualitativa pode-se perceber a presença expressiva de tecido

adiposo, nos espaços medulares dos Grupos RAD e RAD+PTH em relação ao Grupo CONT (Fig.15).

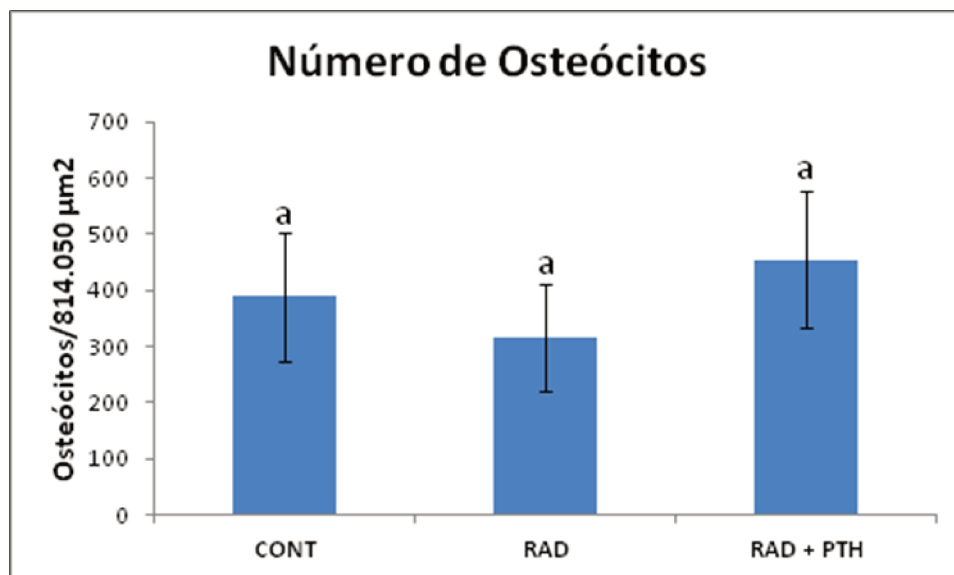


Fig.14: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão do número de osteócitos/ μm^2 nos cortes da tíbia ($p < 0,05$).

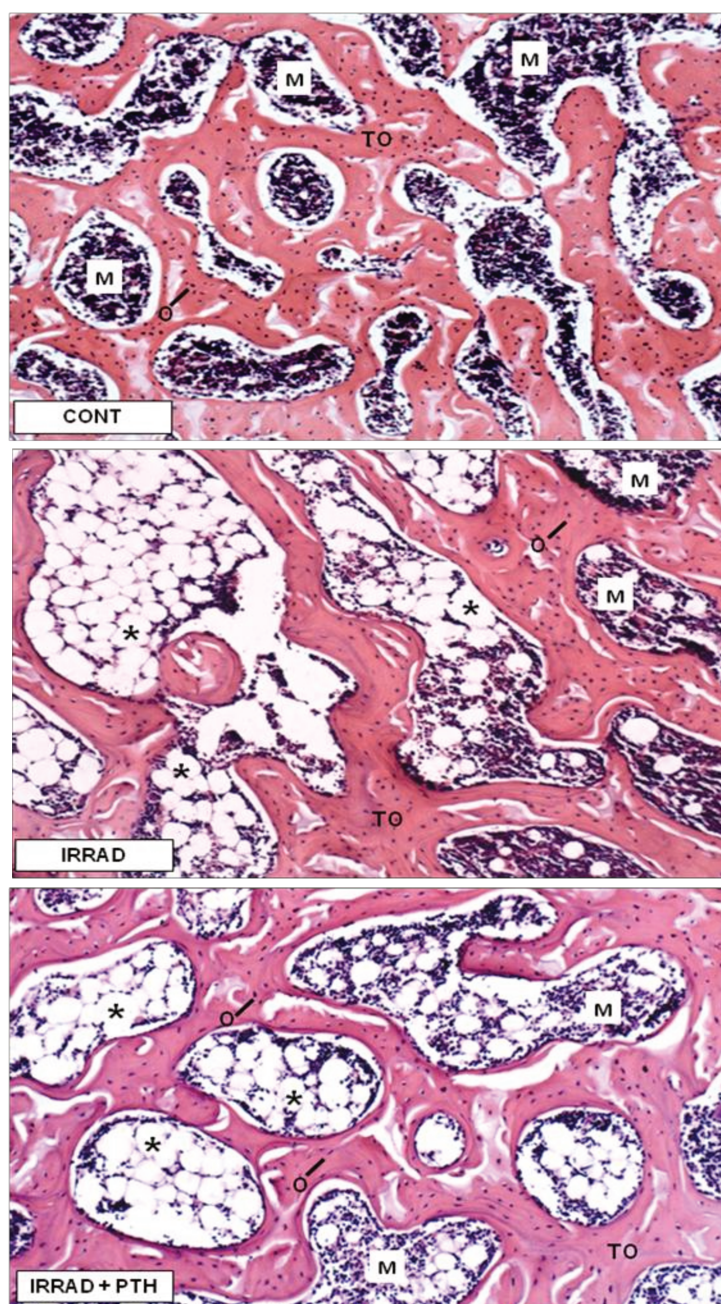


Fig.15: Fotomicrografias de cortes da tíbia (epífise superior), os quais foram corados com H&E. **CONT** – tecido ósseo (TO), presença de osteócitos (O) e espaços medulares contendo apenas tecido medular (M). 100X. **RAD** - tecido ósseo (TO) presença de osteócitos (O) nas trabéculas ósseas, contendo muito tecido adiposo (asteriscos) em meio à pouco tecido medular (M). 100X. **RAD+PTH** - tecido ósseo (TO), com a presença de vários osteócitos (O), constituído por espaços medulares com pouco tecido medular (M) e muito tecido adiposo (asteriscos). 100X.

Nas análises estatísticas referentes aos pesos das peças, mandíbula (hemi) e tíbia, foi observado diferenças apenas em relação ao peso da tíbia, o qual foi maior no Grupo RAD+PTH em comparação ao RAD (Fig. 16). Enquanto que na pesagem da mandíbula não houve diferenças entre os grupos (Fig. 17).

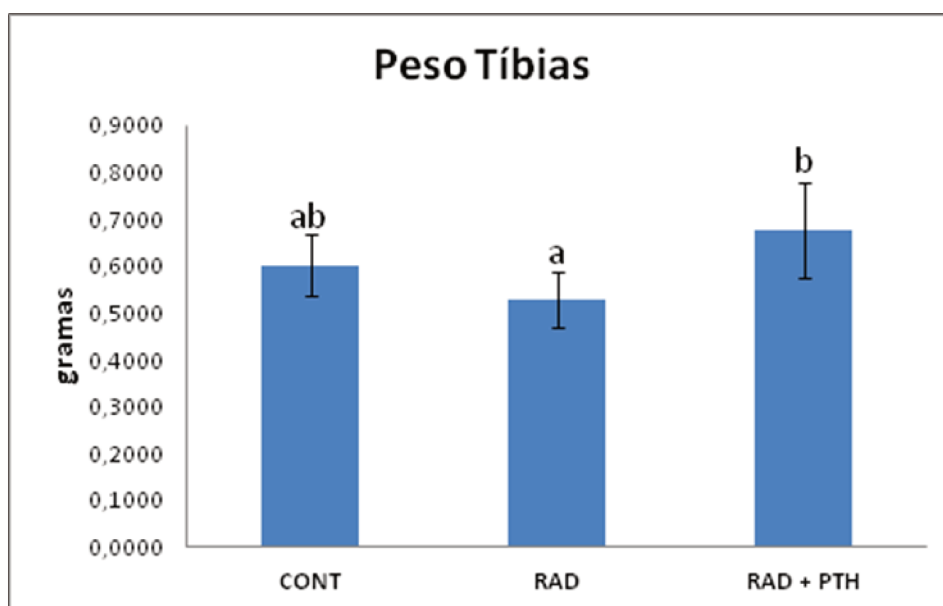


Fig. 16: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão da pesagem das tíbias ($p < 0,05$).

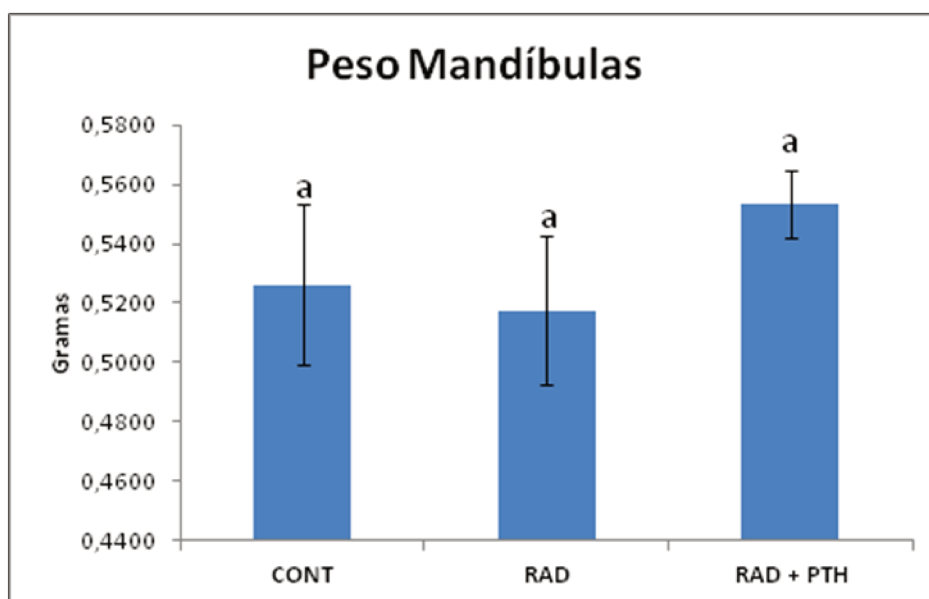


Fig. 17: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão da pesagem das mandíbulas ($p < 0,05$).

Nas análises referentes aos ensaios mecânicos, só houve diferença no ensaio de resistência à compressão, sendo a maior resistência apresentada pelo Grupo RAD+PTH em comparação aos demais grupos (Fig. 18). Nos demais ensaios resistência à flexão (Fig.19) e microdureza Knoop (Fig.20) não houve diferença entre os grupos.

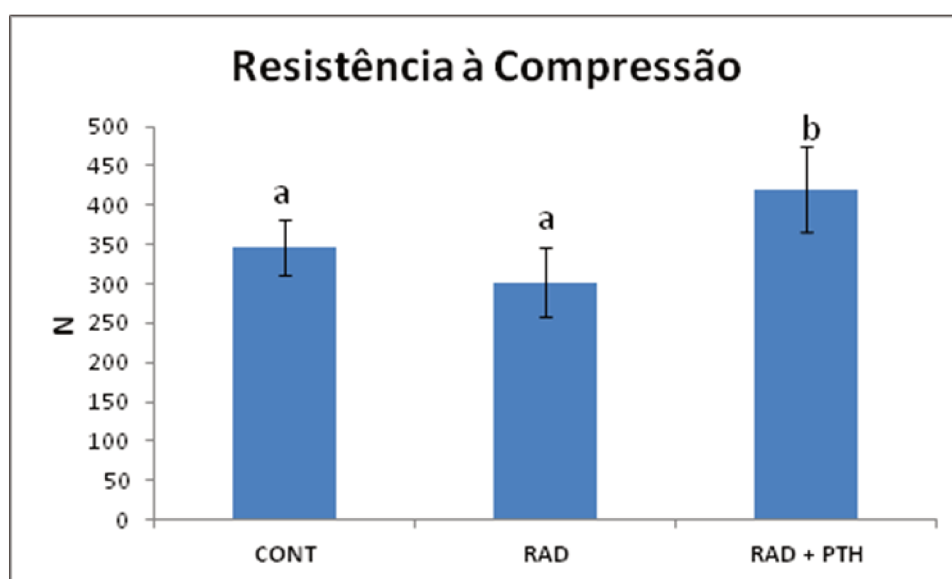


Fig. 18: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio dos valores referentes ao ensaio de resistência à compressão ($p < 0,05$ e $p < 0,01$).

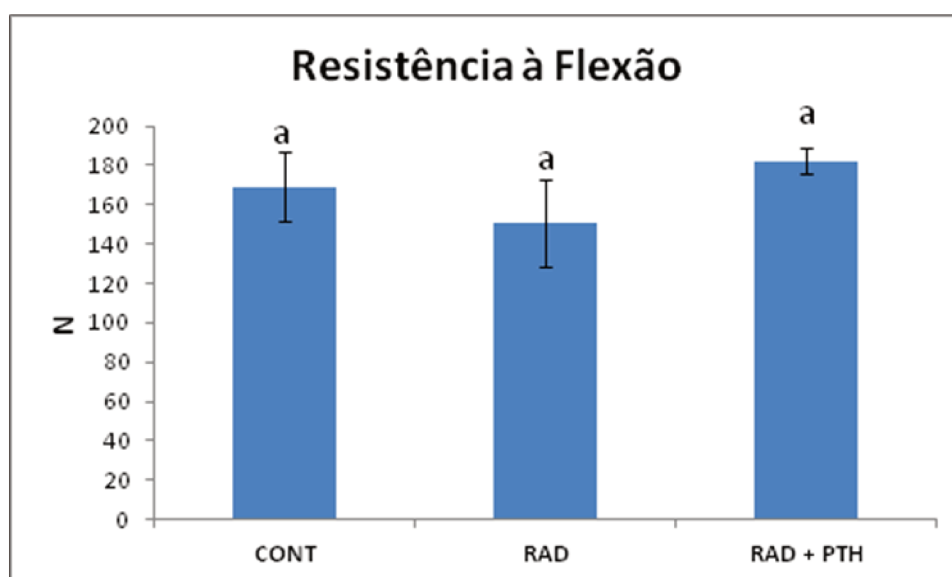


Fig. 19: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão referentes aos valores do ensaio de resistência a flexão ($p < 0,05$).

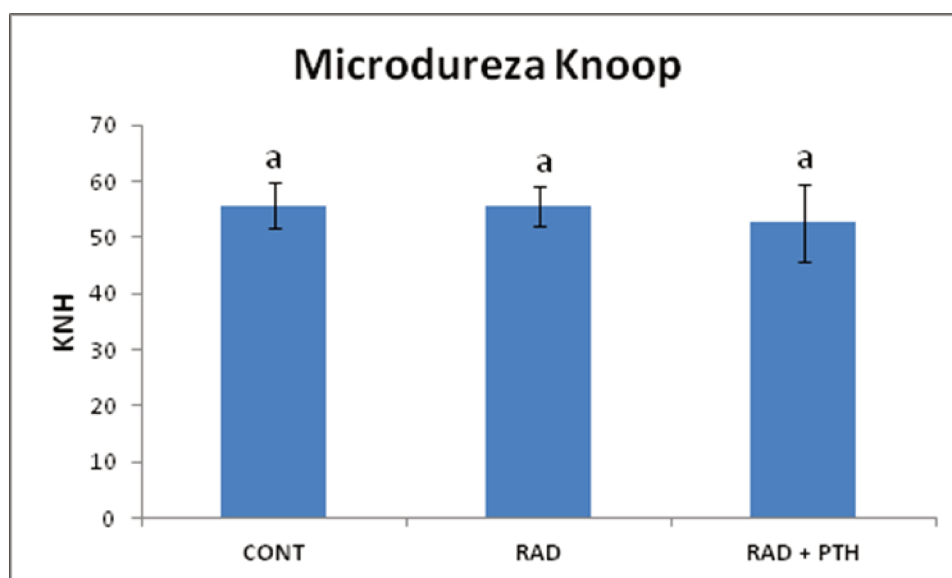


Fig. 20: Gráfico representativo das médias $\pm$ desvio padrão referentes aos valores do ensaio de microdureza Knoop ($p < 0,05$).

Na análise referente ao volume ósseo, densidade da superfície óssea e espessura das trabéculas da mandíbula não houve diferença entre os grupos, sendo amostra A (grupo RAD+PTH), amostra B (Grupo RAD) e amostra C (Grupo CONT) (Fig. 21, 22 e 23).

Volume ósseo da mandíbula (mm³)

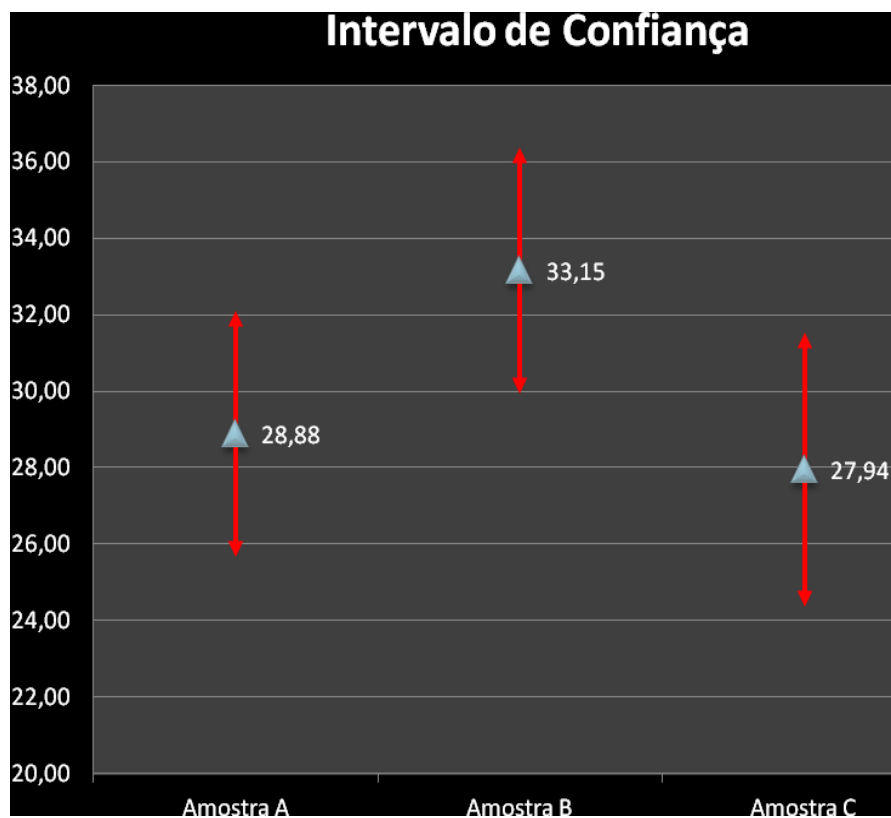


Fig. 21: Gráfico representativo das médias e intervalo de confiança referente aos valores do volume ósseo da mandíbula (mm³) ($p > 0,05$).

Densidade da superfície óssea da mandíbula (superfície óssea/volume total – 1/mm)

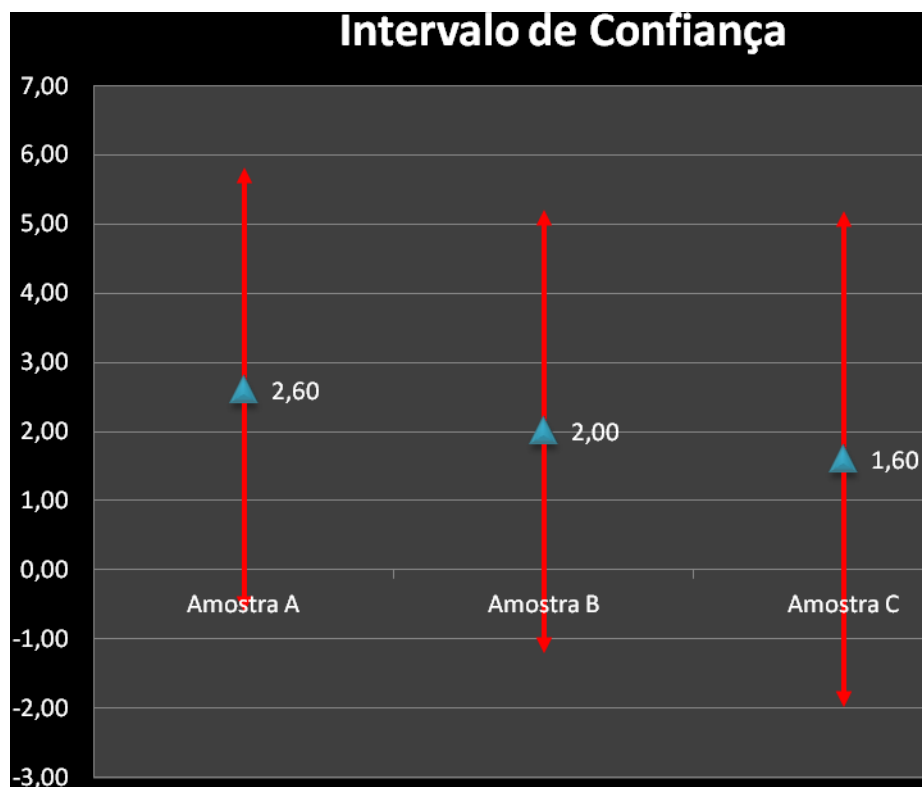


Fig. 22: Gráfico representativo das médias e intervalo de confiança referente à densidade da superfície óssea ($p > 0,05$).

Espessura das trabéculas da mandíbula (mm)

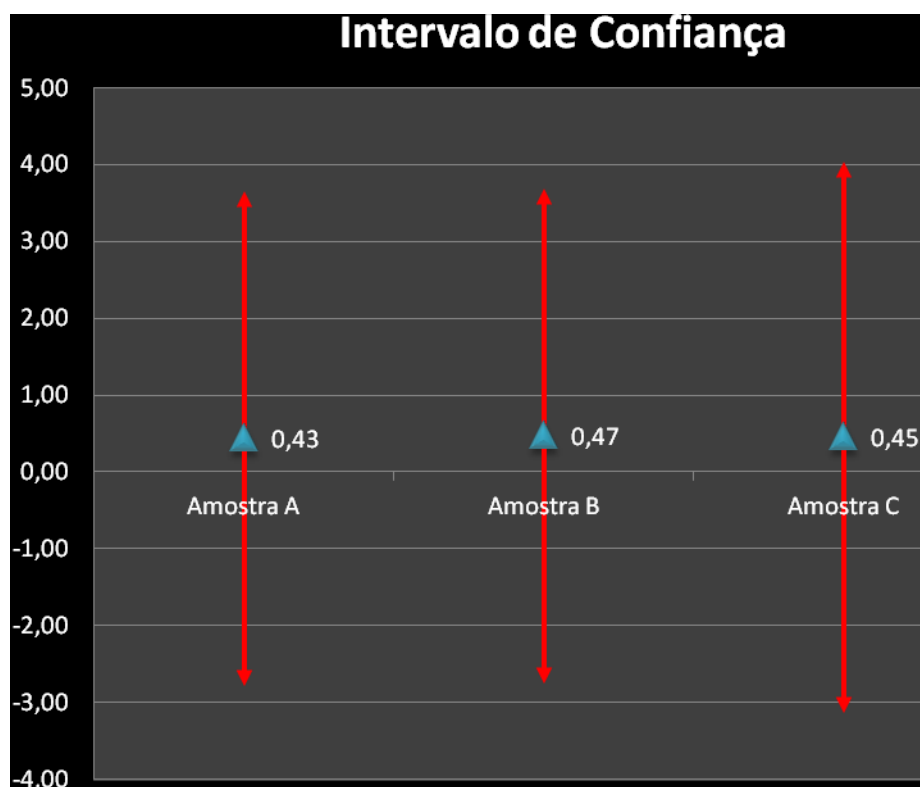


Fig. 23: Gráfico representativo das médias e intervalo de confiança referente aos valores do diâmetro das trabéculas ósseas (mm) ($p > 0,05$).

Na análise referente à densidade da superfície óssea e espessura trabecular da tíbia não houve diferença entre os grupos, sendo amostra A (Grupo RAD+PTH), amostra B (Grupo RAD) e amostra C (Grupo CONT) (Fig. 25 e 26). Entretanto, o Grupo RAD+PTH (A) apresentou maior volume ósseo, e apesar de não haver diferença estatisticamente, houve uma tendência do Grupo Controle (C) apresentar maior volume ósseo em relação ao Grupo RAD (B) (Fig. 24)

Volume ósseo da tíbia (mm^3)

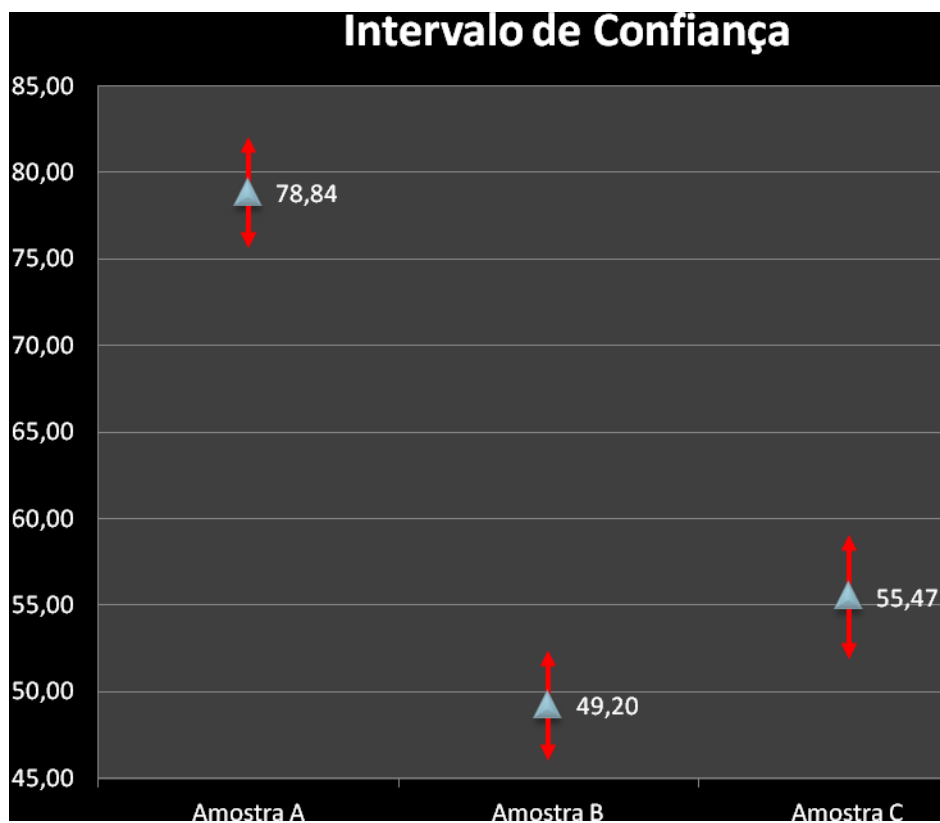


Fig. 24: Gráfico representativo das médias e intervalo de confiança referente aos valores do volume ósseo da tíbia (mm^3) ($p > 0,05$).

Densidade da superfície óssea da tíbia (superfície óssea/volume total – 1/mm)

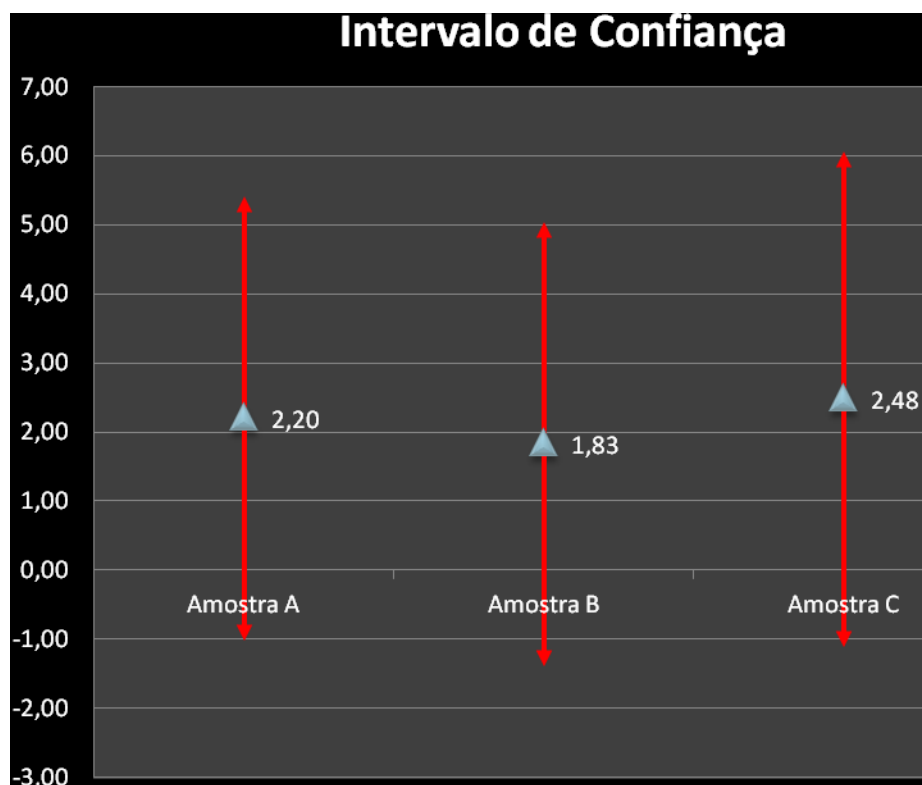


Fig. 25: Gráfico representativo das médias e intervalo de confiança referente à densidade da superfície óssea ($p > 0,05$).

Espessura trabecular da tíbia (mm)

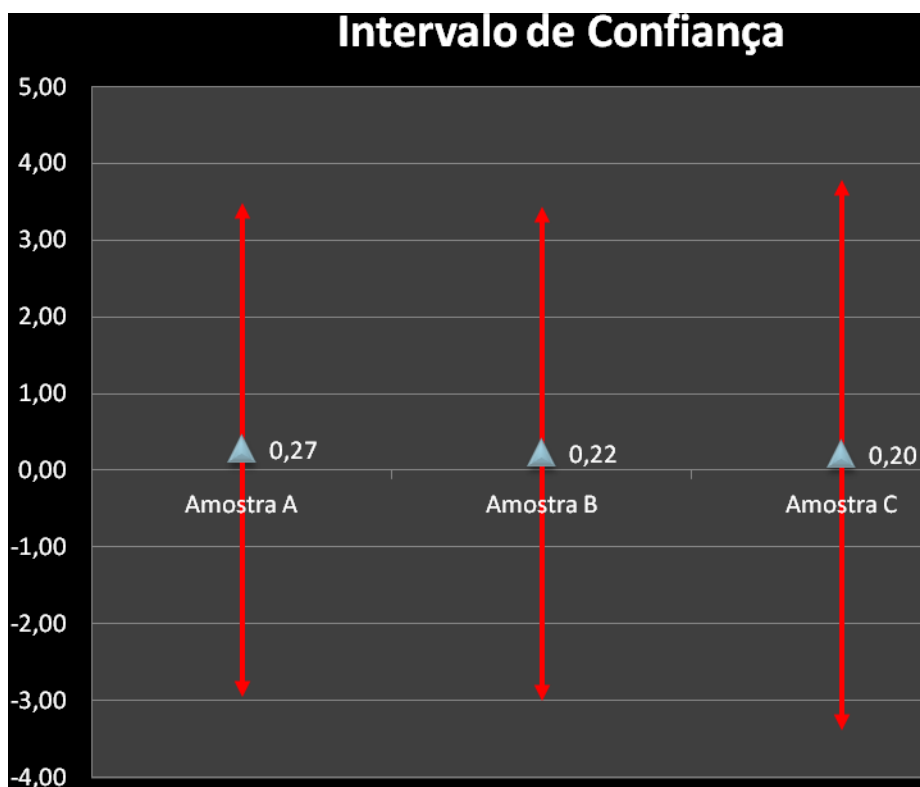


Fig. 26: Gráfico representativo das médias e intervalo de confiança referente aos valores do diâmetro das trabéculas ósseas (mm) ($p > 0,05$).

6 Discussão

No presente estudo, uma combinação de parâmetros morfológicos e físicos foi utilizada para avaliar o efeito da administração intermitente de PTH em animais submetidos à irradiação de corpo inteiro. Alguns dos achados reforçaram os efeitos anabólicos do PTH e a ação prejudicial da irradiação no tecido ósseo. Entretanto, novas evidências foram levantadas, sugerindo a hipótese de uma nova contra indicação a administração intermitente de PTH.

O número acentuado de mortes apresentado pelo Grupo RAD + PTH levanta a possibilidade de alguma interação nociva ou letal provocada pela associação da irradiação de corpo inteiro e administração intermitente de PTH. Apesar da escassez de relatos científicos, segundo a FDA é contra indicado a utilização de PTH em pacientes que foram submetidos à radioterapia envolvendo os ossos pelo maior risco de desenvolver osteossarcoma, incluindo também os que apresentam a doença de Paget e aumentos inexplicáveis de fosfatase alcalina (Miller *et al.*, 2004). Entretanto, diante do modelo de estudo apresentado (irradiação corpo inteiro), do acentuado número de mortes de animais e dos resultados obtidos, pode-se levantar a hipótese de outros tipos de interações nocivas entre PTH e a irradiação. Trabalhos que embasaram este estudo relatam que à dose de 8 Gy corpo inteiro, por si só não é letal, mas há ocorrência frequente da degeneração da medula óssea em ratos (Fajardo *et al.*, 2001; Hosokawa *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2010).

Os efeitos da irradiação também dependem da porcentagem do organismo que é exposto. Por exemplo, mais de 6 Gy costumam provocar a morte quando a irradiação se distribui sobre toda a superfície corporal (The Merck Manual-a), sendo que os resultados deste trabalho em conjunto com o que já existe na literatura (Fajardo *et al.*, 2001; Hosokawa *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2010) mostraram que a radiação de 8 Gy não é letal. No entanto, quando se limita a uma área pequena, como acontece na terapia contra o câncer, é possível aplicar 3 ou 4 vezes esta quantidade sem que se produzam danos graves no organismo. Mas, a distribuição da radiação pelo corpo também é importante. Os tecidos constituídos por células que se multiplicam rapidamente, como o intestino e a medula óssea,

são mais danificados pela irradiação do que os tecidos cujas células se multiplicam mais lentamente, como os músculos e os tendões. Durante a radioterapia contra o câncer, faz-se todo o possível para proteger as partes mais vulneráveis do organismo, com a finalidade de poder utilizar doses mais elevadas (The Merck Manual-a).

A distribuição da irradiação pelo corpo inteiro atua sobre órgãos e estruturas vitais, os quais podem vir a ser atingidos também em irradiações localizadas dependendo da sua proximidade à região e nos casos em que eles são os próprios alvos (The Merck Manual-a). Várias mudanças histológicas ocorrem após a irradiação incluindo perda de osteócitos, ausência de osteoblastos na superfície óssea, fibrose vascular e substituição de medula óssea por tecido adiposo (Arnold *et al.*, 1995). Estas mudanças na estrutura óssea interferem diretamente no processo de remodelação óssea (*turnover*), através desta via, o PTH endógeno, na sua função catabólica, controla o nível de cálcio na corrente sanguínea, ocorrendo uma incapacidade em mobilizar o cálcio a partir dos ossos (Bieglmayer *et al.*, 2002; Quattrochi & Kourlas, 2004).

Outra via de ação do PTH é por meio do intestino, no qual ele aumenta a absorção de cálcio através do aumento da produção da vitamina D ativada. Esta forma ativada de vitamina D aumenta a absorção de cálcio pela via calbindina do intestino (proteínas que se ligam ao cálcio) (Coetzee *et al.*, 2004). Entretanto, a irradiação quanto atinge o intestino pode causar a síndrome aguda gastrointestinal produzida a partir de doses menores de 4Gy, a qual provoca grande desidratação. Inicialmente, a síndrome é provocada pela morte das células que revestem o trato gastrointestinal (mucosa). Os sintomas persistem devido ao desprendimento progressivo do revestimento mucoso e ao desenvolvimento de infecções bacterianas. Finalmente, as células que absorvem nutrientes ficam completamente destruídas, ocorrendo perda de sangue na zona lesionada, o qual caminha para o interior do intestino, normalmente em grandes quantidades. Entre 4 e 6 dias depois da exposição à radiação podem crescer novas células. Mas, mesmo que assim seja, as vítimas que sofrem desta síndrome provavelmente morrerão em virtude de uma insuficiência da medula óssea, entre 2 e 3 semanas

mais tarde (Paula & Foss, 2003; The Merck Manual-a). Portanto mais uma via de regulação dos níveis sanguíneos de cálcio pelo PTH é atingida. Como neste estudo, o PTH e a irradiação foram distribuídos sistemicamente, esta associação tornou-se letal. As mortes no Grupo RAD+PTH, possivelmente, podem ser explicadas pela ocorrência de um quadro de hipocalcemia nos animais, causado pela ação nociva da irradiação ao intestino e ao tecido ósseo, somada ao efeito anabólico proporcionado pela administração de PTH que estimulou, através da utilização/incorporação de cálcio, melhoras em algumas propriedades ósseas encontradas nos resultados deste estudo.

A hipocalcemia pode afetar o cérebro e provocar sintomas neurológicos como confusão, perda da memória, delírio, depressão, alucinações, apatia e sonolência. Estes sintomas são reversíveis caso o cálcio seja repostado. Uma concentração extremamente baixa de cálcio pode causar dores musculares e formigamento nos lábios, língua, dedos das mãos e pés. Também pode provocar convulsões e espasmos dos músculos da garganta (criando dificuldades na respiração), assim como tetania (rigidez geral e espasmos musculares) nos casos mais graves. Podem verificar-se alterações no sistema de condução elétrica do coração, visíveis num electrocardiograma (The Merck Manual-b).

Os animais do grupo RAD+PTH apresentavam alguns dos sintomas descritos como: desidratação, apatia, sonolência e rigidez muscular, além de um odor característico de infecção, os quais sedimentam a hipótese da ocorrência de hipocalcemia, a qual justifica de maneira elusiva a morte destes animais e contra indica a administração de PTH após irradiação de corpo inteiro e até mesmo em irradiações localizadas adjacentes a determinados órgãos, como o intestino. Este resultado é de extrema importância, pois existem muitas perspectivas com relação a este hormônio, pois tem sido mostrado que o PTH aumenta a massa óssea sem causar severos efeitos colaterais (Neer *et al.*, 2001).

A viabilidade do modelo de estudo utilizado no presente projeto foi confirmada por alguns parâmetros avaliados, nos quais foi possível verificar a presença de alterações significativas entre o tecido ósseo do Grupo CONT em comparação ao Grupo RAD, com menor área óssea em todas as regiões analisadas

e menor número de osteoclastos, o qual pode estar relacionado a uma redução na remodelação óssea, confirmando os relatos descritos na literatura das alterações histológicas adversas que ocorrem no tecido ósseo pós irradiação (Marx 1983; Arnold *et al.*, 1995). Entretanto, as diferenças na sobrevivência dos animais do Grupo RAD em relação ao Grupo RAD + PTH mostram que a dose de irradiação (8 Gy) administrada por si só não foi letal, sendo compatível com outros relatos encontrados na literatura (Hosokawa *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2010).

Apesar de haver diferença na área óssea da tíbia apenas entre o Grupo CONT e RAD, foi possível verificar através de uma análise histológica qualitativa a presença de tecido adiposo nos espaços medulares apenas nos Grupos que foram irradiados. Tal fato já havia sido documentado anteriormente através de estudos que mostram as alterações histológicas promovidas pela irradiação (Kiyohara *et al.*, 2003).

O PTH tem ação direta em osteoblastos e seus precursores os quais contêm receptores para este hormônio, estimulando proliferação, diferenciação e sobrevivência destas células (Dean *et al.*, 2005; Jilka, 2007; Aggarwal & Zavras, 2012), podendo explicar o maior peso das tíbias apresentado pelo Grupo RAD+PTH em relação ao Grupo RAD. A ação do PTH em osteoblastos tem sido alvo de diversos estudos que mostram uma complexidade de vias de sinalização reguladas por este hormônio, culminando ou não em anabolismo ósseo (Swarthout *et al.*, 2002; Ferrandon *et al.*, 2009; Datta & Abou-Samra, 2009). Embora o PTH exerça efeito anabólico em várias espécies e modelos experimentais, a sensibilidade de ossos de diferentes partes do esqueleto a este hormônio parece variar, pois tem sido mostrado que mandíbulas são menos sensíveis às ações anabólicas do PTH do que os ossos longos (Hunziker *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009). Muito da atual informação sobre os efeitos do PTH nos ossos craniofaciais deve ser obtida de estudos de outros ossos, o que explica as melhoras ósseas apresentadas pela administração de PTH, apenas no peso da tíbia e no ensaio de compressão do fêmur, sem evidenciar resultados significantes no osso mandibular (região da cortical e da furca).

Os dados obtidos através da uCT novamente sedimentam as informações já descritas na literatura sobre a maior sensibilidade ao PTH pelo ossos longos (Hunziker *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009). O maior volume ósseo da tíbia encontrado no Grupo RAD+PTH, evidencia o efeito anabólico do PTH nestes ossos. Este resultado pode justificar em parte o maior peso também encontrado neste osso durante a pesagem das peças (tíbia e hemimandíbula), além de explicar a não ocorrência de diferenças na área óssea da tíbia no Grupo RAD+PTH em relação aos outros grupos, pois o volume se refere a uma análise tridimensional, enquanto a área é apenas bidimensional.

O melhor resultado apresentado no ensaio de resistência à compressão pelo Grupo RAD+PTH é mais um fator que ressalta a maior sensibilidade de ossos longos ao PTH. Outro fator relevante deste resultado está nas suas implicações, pelo fato da compressão produzir quantidades consideráveis de stress e tensão. Um exemplo característico de objeto submetido a esforços de compressão são as colunas dos prédios, que recebem, na mesma direção de seu eixo, as cargas acima delas. Portanto, este exemplo pode ser transposto para o fêmur, osso longo, o qual também recebe forças na mesma direção de seu eixo das cargas presentes acima dele, tanto quando uma pessoa ou animal encontra-se na posição vertical, como também durante os movimentos de caminhada e corridas.

Trabalhos mostram que administração intermitente de PTH além de aumentar a densidade mineral óssea em mulheres com osteoporose (Neer *et al.*, 2001) e em ratos ovariectomizados (Andersson *et al.*, 2001), aumentou também a resistência de ossos longos a fratura (Komrakova *et al.*, 2010). Nakajima e colaboradores (2002) verificaram que a dose diária de 10µg/kg significativamente aumentou a resistência mecânica de calos de fratura em fêmures de ratos, enquanto a dose de 2µg/kg não teve efeito significativo.

Vários estudos direcionam-se em entender o mecanismo anabólico do PTH no tecido ósseo. Este hormônio parece ter um efeito amplo, alterando diretamente ou indiretamente a expressão de diversos genes e por diferentes vias, por este motivo o PTH tem sido o alvo de várias pesquisas. Alguns trabalhos têm mostrado um papel crítico da via de sinalização Wnt no efeito anabólico induzido pelo PTH

(Bodine *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2010). A via de sinalização Wnt, assim como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são críticas para a osteoblastogênese, porque elas fornecem o estímulo inicial para o comprometimento de progenitores mesenquimais em direção à linhagem osteoblástica. A expressão do gene *Sost* resulta na produção da proteína Esclerostina pelos osteócitos e esta proteína é um potente antagonista de BMPs e da via de sinalização Wnt. PTH parece reduzir a expressão de *Sost* em osteócitos, e estimular desta forma os efeitos pro-osteoblastogênicos (Bellido *et al.*, 2005).

Portanto, existem muitas perspectivas com relação a este hormônio, o qual até o momento, aumenta a massa óssea sem causar severos efeitos colaterais, ou seja, sem grandes contra indicações. Portanto, novas investigações sobre o efeito e mecanismo de ação do PTH no tecido ósseo sadio e irradiado são importantes. Ademais, este trabalho promove um novo direcionamento em relação aos possíveis efeitos adversos da associação de PTH e irradiação de corpo inteiro, ou acometendo órgãos vitais, sendo necessários novos e aprofundados estudos para determinar de forma definitiva o tipo de interação nociva ocorrida.

7 Conclusão

No modelo experimental utilizado neste trabalho, foi possível concluir que:

- A administração intermitente de PTH após irradiação de corpo inteiro é capaz de melhorar alguns parâmetros referentes à qualidade óssea;
- O uso de PTH em ratos submetidos a irradiação de corpo inteiro pode ser letal.

Referências*

Aggarwal P, Zavras A. Parathyroid hormone and its effects on dental tissues. *Oral Dis.* 2012; 18(1): 48-54.

Andersson N, Lindberg MK, Ohlsson C, Andersson K, Ryberg B. Repeated in vivo determinations of bone mineral density during parathyroid hormone treatment in ovariectomized mice. *J Endocrinol.* 2001; 170(3): 529-37.

Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(6): 960-8.

Arnold M, Kummermehr J, Trott K-R. Radiation-induced impairment of osseous healing: quantitative studies using a standard drilling defect in rat femur. *Radiat Res.* 1995; 143(1): 77-84

Arrington SA, Fisher ER, Willick G, Mann KA, Allen MJ. Anabolic and antiresorptive drugs improve trabecular microarchitecture and reduce fracture risk following radiation therapy. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87(3): 263–72.

Aslan D, Andersen MD, Gede LB, de Franca TK, Jørgensen SR, Schwarz P, *et al.* Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012; 72(1): 14-22.

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. *J Bone Miner Re.* 2010; 25(2): 404–14.

Barros SP, Silva MAD, Somerman MJ, Nociti Jr FH. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res.* 2003; 82(10): 791-5.

Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM, *et al.* Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *New Engl J Med.* 2010; 363(25): 2396-405.

Bauer D, *et al.* Short-term changes in bone turnover markers and bone mineral density response to parathyroid hormone in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(4): 1370-5.

Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, *et al.* Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinol.* 2005; 146(11): 4577-83.

Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone.* 2012; 1-8.

Bertho JM, Mathieu E, Lauby A, Frick J, Demarquay C, Gourmelon P, *et al.* Feasibility and limits of bone marrow mononuclear cell expansion following irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2004; 80(1): 73-81.

Bieglmayer C, Prager G, Niederle. Kinetic analyses of parathyroid hormone clearance as measured by three rapid immunoassays during parathyroidectomy. *Clin Chem.* 2002; 48(10): 1731-8.

Bodine PV, Seestaller-Wehr L, Kharode YP, Bex FJ, Komm BS. Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1. *J Cell Physiol.* 2007; 210(2): 352-7.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using MicroComputed Tomography. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(7): 1468-86.

Brown RK, Pelker RR, Friedlaender GE, Peschel RE, Panjabi MM. Postfracture irradiation effects on the biomechanical and histologic parameters of fracture healing. *J Orthop Res.* 1991; 9(6): 876-82.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003; 425(6960): 841-6.

Canalis E, Centrella M, Bach W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of PTH on bone cell cultures. *J Clin Invest.* 1989; 83: 60-5.

Cao X, Wu X, Frassica D, Yua B, Panga L, Xiana L, *et al.* Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *PNAS.* 2011; 108(4): 1609-14.

Centro de Informação Metal Mecânica – CIMM. [acesso 2013 Feb 20]. Disponível em: http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6560-teste-da-microdureza#.URL6jB2M53E.

Civitelli R, Hruska KA, Shen V, Avioli LV. Cyclic AMP-dependent and calcium-dependent signals in parathyroid hormone function. *Exp Gerontol.* 1990; 25(3-4): 223-31.

Coetzee M, Kruger MC. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment?. *South Med J.* 2004; 97(5): 506-11.

Compston J. Recombinant parathyroid hormone in the management of osteoporosis. *Calcif Tiss Int.* 2005; 77(2): 65-71.

Costantino PD, Friedman CD, Steinberg MJ. Irradiated bone and its management. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995; 28(5): 1021-38.

Damron TA, Margulies BS, Strauss JA, O'Hara K, Spadaro JA, Farnum CE. Sequential histomorphometric analysis of the growth plate following irradiation with and without radioprotection. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A(7): 1302-13.

Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal.* 2009; 21(8): 1245-54.

Dean T, Khatri A, Potetinova Z, Willick G, Gardella TJ. Mechanism of interaction between the (17-31) binding domain of PTH and the PTH receptor. In: Blondelle SE (ed.). *Understanding biology using peptides.* San Diego, CA: American Peptide Society, 2005. p.344-346.

Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A, *et al.* Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol.* 2005; 84(11): 722-7.

Dobnig H, Sipos A, Jiang Y, Fahrleitner-Pammer A, Ste-Marie LG, Gallagher JC, *et al.* Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(7): 3970-7.

Epperly MW, Guo H, Shen H, Niu Y, Zhang X, Jefferson M, *et al.* Bone marrow origin of cells with capacity for homing and differentiation to esophageal squamous epithelium. *Radiat Res.* 2004; 162(3): 233-40.

Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE. Oxford University Press, New York. 2001; Cap 25: 379-87.

Feitosa DS, Marques MR, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, de Toledo S. The influence of thyroid hormones on periodontitis-related bone loss and tooth-supporting alveolar bone: a histological study in rats. *J Periodontal Res.* 2009; 44(4): 472-8.

Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, *et al.* Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* 2009; 5(10): 734-42.

Food and Drug Administration: FDA. Development of parathyroid hormone for the prevention and treatment of osteoporosis. May 2000. [acesso 2013 Jan 15]. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071618.pdf>.

Garrett RW, Emerson SG. Bone and blood vessels: The hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(6): 503-6.

Gerson SL. Mesenchymal stem cells: No longer second class marrow citizens. *Nat Med.* 1999; 5(3): 262-4.

Grauschopf U, Lilie H, Honold K, Wozny M, Reusch D, Esswein A, *et al.* The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone-binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry.* 2000; 39(30): 8878-87.

Greenberger JS, Epperly M. Bone marrow-derived stem cells and radiation. *Semin Radiat Oncol.* 2009; 19(2): 133-9.

Greenberger JS, Epperly MW. Review. Antioxidant gene therapeutic approaches to normal tissue radioprotection and tumor radiosensitization. *In Vivo.* 2007; 21(2): 141-6.

Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, *et al.* Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev.* 2005; 26(5): 688-703.

Hosokawa Y, Sakakura Y, Tanaka L, Okumura K, Yajima T, Kaneko M. Effects of local and whole body irradiation on appearance of osteoclasts during wound healing of tooth extraction sockets in rats. *J Radiat Res.* 2007; 48(4): 273-80.

Hosokawa Y, Sakakura Y, Irie K, Kudo K, Kashiwakura I. Effects of local and whole body irradiation on the appearance of osteoblasts during wound healing in tooth extraction sockets in rats. *J Radiat Res.* 2010; 51(2): 181-6.

Hunziker J, Wronski TJ, Miller SC. Mandibular bone formation rates in aged ovariectomized rats treated with anti-resorptive agents alone and in combination with intermittent parathyroid hormone. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1431-8.

Jegoux F, Malard O, Goyenvallé E, Aguado E, Daculsi G. Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(2): 173-84.

Jerezek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev.* 2002; 28(1): 65-74.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418(6893): 41-9.

Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007; 40(6): 1434-46.

Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, *et al.* Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood.* 2004; 104(12): 3581-7.

Kiyohara S, Sakurai T, Kashima I. Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. *Dentomaxillofac Radiol.* 2003; 32(1): 30-8.

- Koh AJ, Novince CM, Li X, Wan T, Taichman RS, MacCauley LK. An Irradiation-Altered Bone Marrow Microenvironment Impacts Anabolic Actions of PTH. *Endocrinology*. 2011; 152(12): 4525-36.
- Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, *et al*. Effect of human parathyroid hormone hPTH(1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 2010; 47(3): 480-92.
- Kramer I, Keller H, Leupin O, Kneissel M. Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(4): 237-44.
- Krause DS, Theise ND , Coletor MI , Henegariu O , S Hwang , Gardner R, *et al*. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105(3): 369-77.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, *et al*. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004; 40(6): 1275-84.
- Lee M, Partridge NC. Parathyroid hormone signaling in bone and kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009; 18(4): 298-302.
- Li X, Liu H, Qin L , Tamasi J , Bergenstock M , Shapses S, *et al*. Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. *J. Biol. Chem*. 2007; 282(45): 33086-97 a.
- Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J. Biol. Chem*. 2007; 282(45), 33098-106 b.
- Liu H, Guo J, Wang L, Chen N, Karaplis A, Goltzman D, *et al*. Distinctive anabolic roles of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone in teeth and mandible versus long bones. *J Endocrinol*. 2009; 203(2): 203-13.

Luck MD, Carter PH, Gardella TJ. The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amin-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol Endocrinol*. 1999; 13(5): 670-80.

Marques MR, Silva MAD, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH Jr, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(4): 421-9.

Martin TJ, Sims N A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005; 11(2): 76-81.

Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983; 41(5): 283-8.

Mauch P, Constine L, Greenberger J, Knospe W, Sullivan J, Liesveld JL, *et al*. Hematopoietic stem cell compartment: Acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995; 31(5): 1319-39.

McClung MR, San Martin J, Miller PD, Civitelli R, Bandeira F, Omizo M, *et al*. Opposite bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. *Arch Intern Med*. 2005; 165(15): 1762-8.

Miller PD, Bilezikian JP, Deal C, Harris ST, Pacifici R. Clinical use of teriparatide in the real world: initial insights. *Endocr Pract*. 2004; 10(2): 139-48.

Miller SC, Hunziker J, Mecham M, Wronski TJ. Intermittent parathyroid hormone administration stimulates bone formation in the mandibles of aged ovariectomized rats. *J Dent Res*. 1997; 76(8): 1471-6.

Million RR, Parsons JT and Mendenhall WM. Effect of radiation on normal tissues in the head and neck. Bone, cartilage, and soft tissue. *Front Radiat Ther Oncol*. 1989 23: 221-37.

Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-1 in growing mice. *Endocrinology*. 2001; 142(10): 349-56.

Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA. Mechanism 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.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1434-41.

Onyia JE, Helvering LM, Gelbert L, Wei T, Huang S, Chen P, *et al*. Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem*. 2005; 95(2): 403-18.

Paula FJA, Foss MC. Tratamento da hipercalcemia e hipocalcemia. *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: urgências e emergências endócrinas, metabólicas e nutricionais*. 2003; 36: 370-4.

Pettway GJ, Meganck JA, Koh AJ, Keller ET, Goldstein SA, McCauley LK. Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation. *Bone*. 2008; 42(4): 806-18.

Poole K, Reeve J. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5(6): 612-7.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276(5309): 71-4.

Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2004; 15(2): 60-5.

Quattrocchi E, Kourlas H. Teriparatide: a review. Clin Ther. 2004; 26(6): 841-54.

Rieger K, Marinets O, Fietz T, Körper S, Sommer D, Mücke C, *et al.* Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. Exp Hematol. 2005; 33(5): 605-11.

Rixon RH, Whitfield JF, Youdale T. Increased survival of rats irradiated with x- rays and treated with parathyroid extract. Nature. 1958; 182(4646): 1374.

Rixon RH, Whitfield JF. The radioprotective action of parathyroid extract, Int J Radiat Biol. 1961; 3: 361-7.

Rossi AC, Freire AR, Dornelles RCM. Osteoporose: considerações sobre terapêuticas atuais e metabolismo ósseo. Int J Dent. 2010; 9: 210-4.

Rubin MR, Bilezikian JP. Parathyroid Hormone as an anabolic skeletal therapy. Drugs. 2005; 65(17): 2481–98.

Seebach C, Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Intermittent parathyroid hormone (1-34) enhances mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats. J Orthop Res. 2004; 22(3): 472-8.

Shaheen M, Deheshi BM, Riad S, Werier J, Holt GE, Ferguson PC, *et al.* Prognosis of radiation-induced bone sarcoma is similar to primary osteosarcoma. Clin Orthop Relat Res. 2006; 450: 76–81.

Silverman S Jr. Current concepts in the management of oral/dental adverse sequelae of head and neck radiotherapy. In: Meyer JL ed. Radiation Injury. Advances in Management and Prevention. Front Radiat Ther Onco. 1999; 32: 34-48.

Skripitz R, Böhling S, Rütther W, Aspenberg P. Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34) - a histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel. J Orthop Res. 2005; 23(6): 1266-70.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormonedependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*. 2002; 282(1-2): 1-17.

The Merck manual – Home Edition - a. Acidentes e Lesões - Lesões causadas pela radiação. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. [acesso 2013 Feb 2]. Disponível em: <http://www.manualmerck.net/?id=305>.

The Merck manual – Home Edition - b. Perturbações da nutrição e do metabolismo - Equilíbrio do sal.. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. [acesso 2013 Feb 2]. Disponível em: <http://www.manualmerck.net/?id=163&cn=1286>.

Vavrova J, Vokurkova D, Marekova M, Blaha M, Jebavy L, Filip S. Antiapoptotic cytokine IL-3 β SCF β FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133 β /CD34 β progenitor cells. *Folia Biol*. 2002; 48(2): 51-7.

Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso- Cerri E , Tanomaru-Filho M , Cerri PS. Biocompatibilidade de um cimento MTA experimental implantado no subcutâneo de ratos: avaliação quantitativa e imuno-histoquímico. *J Mater Biomed Res B Appl Biomater*. 2012; 100B(7): 1773-81.

Whitfield JF. Parathyroid Hormone (PTH) and Hematopoiesis: New Support for Some Old Observations. *J Cell Biochem*. 2005; 96(2): 278-84.

Wu X, Pang L, Lei W, Lu W, Li J, Li Z, et al. Inhibition of Sca-1-positive skeletal stem cell recruitment by alendronate blunts the anabolic effects of parathyroid hormone on bone remodeling. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(5): 571-80.

Yao M, Terris DJ. Surgical management of radiation-injured tissues of the head and neck. In: Meyer JL ed. *Radiation Injury. Advances in Management and Prevention*. Front Radiat Ther Oncol. 1999; 32: 49-62.

Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Invest. 2006; 116(5): 1195–201.



CEUA/Unicamp

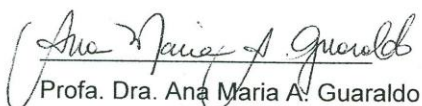
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

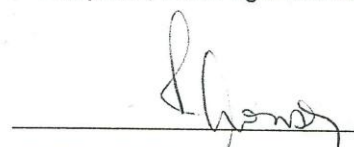
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da aplicação intermitente de PTH na qualidade óssea de ratos e células osteogênicas submetidas a irradiação" (protocolo nº 2788-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques / Naiana Viana Viola, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de agosto de 2012.

Campinas, 09 de agosto de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>