

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

RENATO CÉSAR CÔRTEZ ROSA

**A INTERFERÊNCIA DA HIDROCLOROTIAZIDA NO REPARO DE LESÕES
ÓSSEAS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR**

Uberlândia – MG

Julho/2017

RENATO CÉSAR CÔRTEZ ROSA

**A INTERFERÊNCIA DA HIDROCLOROTIAZIDA NO REPARO DE LESÕES
ÓSSEAS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso Medicina Veterinária,
da Universidade Federal de Uberlândia -
UFU, como requisito parcial à aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio
Dantas Mota.

Uberlândia – MG

Julho/2017

RENATO CÉSAR CÔRTEZ ROSA

**A INTERFERÊNCIA DA HIDROCLOROTIAZIDA NO REPARO ÓSSEO
INDUZIDO EM RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso Medicina Veterinária,
da Universidade Federal de Uberlândia -
UFU, como requisito parcial à aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio
Dantas Mota.

Aprovado em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Esp. Leandro Willian Borges

Prof^a. Dr^a. Aracelle Elisiane Alves

Prof^o. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Maior, pela vida, saúde e inteligência durante toda a graduação, que me propiciou a oportunidade do estudo e entendimento da importância da minha profissão. Minha gratidão pela maturidade e discernimento no momento da decisão pela graduação em Medicina Veterinária. Agradeço aos irmãos espirituais que me acompanharam durante todos esses anos, trazendo energias de ânimo e coragem para enfrentar as dificuldades do aprendizado.

Aos meus pais, Sônia Beatriz e João Batista, minha enorme gratidão à minha vida, meus princípios e o grande apoio nas minhas escolhas. Agradeço as inúmeras orações pela minha proteção e sucesso em meus estudos. Vocês são meus espelhos, onde busco sempre a referência de simplicidade, humildade e caráter exemplar.

A minha esposa, Augusta Ferreira, por acreditar no meu potencial, por me incentivar, encorajar e proporcionar a conquista do maior sonho da minha vida, a graduação em Medicina Veterinária. Foram inúmeras vezes em que seu carinho e seu amor, me encorajou e me impulsionou, em busca do meu propósito, sempre confiando na minha capacidade, enxergando em mim o Médico Veterinário que me torno agora. Seus conselhos, apoio e amizade foram de extrema importância para minha graduação. Obrigado pelo entendimento das ausências nos fins de semanas quando estudava e pela minha ausência noturna quando virava a noite estudando. Você foi essencial para realização de tudo isso.

Ao grupo dos “Sobreviventes” agradeço imensamente, Luciana Ribeiro, Karina Sonálio e Jéssica Soares, pelo companheirismo e cumplicidade durante toda minha trajetória. A amizade gerada na graduação que levarei para toda vida.

Meus agradecimentos ao *Institute of Biomedical Sciences* - ICBIM, pela colaboração na execução deste trabalho no Laboratório. Agradeço de forma particular ao professor Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva, pelas suas orientações e ensinamentos.

Pela minha orientação exemplar, agradeço ao meu professor Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota, que com seu imenso conhecimento me conduziu pelos caminhos da pesquisa, oferecendo a participação neste projeto, que foi de extrema importância para meu aprendizado.

RESUMO

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído por uma população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação celular. Está em equilíbrio dinâmico, com regulação da mobilização e deposição mineral, durante a vida do indivíduo. É um tecido metabolicamente que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. Diversos são os tipos de fraturas e suas causas etiológicas podem partir de eventos patológicos a traumáticos. Sendo assim o processo de remodelação óssea desenvolve-se com base em dois processos antagônicos, mas acoplados: a formação e a reabsorção óssea a cargo das células das linhas osteoblástica e osteoclástica. Várias técnicas de avaliação têm sido propostas para o diagnóstico e acompanhamento da regeneração óssea. Por exemplo, as radiografias são usadas para dar informações qualitativas sobre a linha de fratura e observar a união dos fragmentos ósseos, ou mesmo quantificar parâmetros da geometria, porém é incapaz de prever a rigidez do calo. Existem ainda as opções sobre o efeito de algumas medicações entre outras. Sendo assim, objetivou-se neste trabalho verificar a atuação da hidroclorotiazida no processo de regeneração óssea após lesão por escareação na tíbia de ratas Wistars. Para tal, foram utilizados 24 animais fêmeas, divididos em dois grupos contendo cada 12 animais: grupo I ou controle e grupo II ou hidroclorotiazida. Estes grupos foram subdivididos em 02 subgrupos de 06 animais cada, analisados aos 7 e 15 dias da lesão na tíbia realizado com procedimento cirúrgico com animais devidamente sedados. Em suma, este trabalho mostrou que a hidroclorotiazida não favorece maior formação de tecido ósseo primário em comparação ao grupo controle, porém pode observar que o grupo tratado com a Hidroclorotiazida obteve uma maior maturação de tecido ósseo secundário ou permanente em comparação ao grupo controle.

Palavras-chaves: Consolidação de Fratura. Regeneração Óssea. Tecido Ósseo. Tiazidas.

ABSTRACT

Bone is a multifunctional, metabolically very active tissue composed of a heterogeneous population of cells at different stages of cell differentiation. It is in dynamic equilibrium, with regulation of the mobilization and mineral deposition, during the life of the individual. It is a metabolically fabric that undergoes a continuous process of renovation and remodeling. Several are the types of fractures and their etiological causes can leave and pathological to traumatic events. Thus, bone remodeling develops based on two antagonistic but coupled processes: bone formation and resorption by osteoblastic and osteoclast lines. Several evaluation techniques have been proposed for the diagnosis and follow-up of bone regeneration. For example, radiographs are used to give qualitative information about the fracture line and to observe the union of the bone fragments, or even to quantify parameters of the geometry, but it is unable to predict the stiffness of the callus. There are also options on the effect of some medications among others. Therefore, the objective of this study was to verify the performance of hydrochlorothiazide in the process of bone regeneration after tibial remarking of Wistars rats. For this, 24 female animals were used, divided into two groups containing each 12 animals: group I or control and group II or hydrochlorothiazide. These groups were subdivided into 02 subgroups of 06 animals each, analyzed at 7 and 15 days of tibial lesion performed with a surgical procedure with properly sedated animals. In summary, this study showed that hydrochlorothiazide does not favor greater formation of primary bone tissue in comparison to the control group, but it can be observed that the group treated with Hydrochlorothiazide obtained a greater maturation of secondary or permanent bone tissue in comparison to the control group.

Keywords: Fracture Consolidation. Bone Regeneration. Bone Tissue. Thiazides.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATÓES

% – Percentagem;

+ – Osso primário;

↑ – Matriz óssea secundária;

® – Marca registrada;

ad libitum – a vontade;

ARFIS – Área de Ciências Fisiológicas;

C – cortical óssea;

Ca²⁺ - Íon Cálcio;

CEBEA - Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal;

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais;

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária;

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético;

et al – E colaboradores;

F – Frequência;

GL – Grau de Liberdade;

HE – Hematoxilina-Eosina;

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas;

kg – quilogramas;

M – Medula óssea;

mg – Miligramas;

NO – Neoformação óssea;

°C – Grau celsius;

RPM – Rotação por minuto;

SIG – Significância;

UFU – Universidade Federal de Uberlândia;

UI – Unidades Internacionais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O tecido ósseo e suas estruturas	14
Figura 2 – Desenho representativo de fratura fechada e fratura exposta	15
Figura 3 – Tipos de fraturas dos ossos	16
Figura 4 – Fluxograma de distribuição dos grupos controle e tratamento ...	20
Figura 5 – Etapas cirúrgicas para realização da lesão óssea, na metáfise proximal da tíbia de ratas	21
Figura 6 – Extensão de citologia vaginal de ratas em período de estro	22
Figura 7 – Administração dos fármacos pelo método de gavagem em um dos animais do experimento	23
Figura 8 – Fotomicrografia de secção longitudinal da tíbia dos animais do grupo 2	25
Figura 9 – Concentração plasmática de Ca^{2+} entre os grupos controle e tratamento hidroclorotiazida aos sete e quinze dias de tratamento	27
Figura 10 – Fotomicrografia de seção longitudinal de tíbia, aos sete e quinze dias de tratamento	28
Figura 11 – Porcentagem de neoformação óssea entre os grupos controle e tratamento hidroclorotiazida aos sete e quinze dias de tratamento	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVO	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4.1 O Tecido Ósseo	13
4.2 Fraturas Ósseas	15
4.3 Reparo das Fraturas	17
4.4 Hidroclorotiazida	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Animais	19
5.2 Grupos Experimentais	19
5.3 Preparações do Veículo e Medicamento	20
5.4 Procedimento Cirúrgico	20
5.5 Administração dos fármacos em estudo	22
5.6 Análise da Concentração Plasmática de Cálcio (Ca ²⁺)	23
5.4 Eutanásia.....	24
5.5 Análise Histológica e Histomorfométrica.....	24
5.7 Análise Estatística.....	25
6. RESULTADOS.....	27
6.1 Concentração Plasmática de Ca ²⁺	27
6.2 Análise Histológica.....	28
6.3 Análise Histomorfométrica	31
7. DISCUSSÃO	32
8. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO	39
Anexo I - Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA).	40

1. INTRODUÇÃO

A mineralização da matriz confere a este tecido uma extrema dureza, o que lhe permite desempenhar importantes funções de sustentação e proteção. Por sua vez, a matriz colagênica proporciona-lhe uma certa maleabilidade fornecendo-lhe algumas possibilidades de extensão e flexão. A matriz óssea representa, também, o maior reservatório de íons minerais do organismo, particularmente de cálcio e fósforo, participando ativamente na manutenção da homeostase dos níveis de cálcio no sangue e, conseqüentemente, em todos os fluidos tissulares, condição essencial para a preservação da vida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo é um dos tecidos com maior capacidade de reparação, exibindo um potencial de regeneração surpreendente, capaz de restaurar perfeitamente sua estrutura original e suas propriedades mecânicas. No entanto, o conhecimento sobre os múltiplos mecanismos ósseos regulatórios devem tanto auxiliar o entendimento sobre a remodelação óssea quanto oferecer explicações para as alterações que ocorrem em várias enfermidades, sendo esse estudo de extrema importância (KAWAMOTO; NAGAOKA, 2000).

A consolidação de uma fratura é um dos mais notáveis processos de reparo do corpo humano, porque dela resulta não somente uma cicatrização, mas uma reconstituição do tecido lesado em outro semelhante à sua formação original. Isto acontece porque o osso está continuamente sendo depositado e absorvido, gerando assim um processo de remodelagem constante do mesmo (CORMACK, 2003).

O reparo de tecidos musculoesqueléticos ocorre por meio de resposta tecidual composta de três fases, que não ocorrem separadamente e são descritas como inflamação, reparação e remodelação (MULLER, 2004).

A aplicabilidade do uso de drogas com a função de remodelação do tecido ósseo pode aumentar a afetividade dos processo básicos que direcionam e regulam a reparação do tecido. Sendo assim, objetivou-se neste trabalho, pesquisar a influência da hidroclorotiazida sobre o processo de remodelação óssea em ratos da raça Wistar.

2. JUSTIFICATIVA

A não consolidação óssea é um dos principais problemas encontrados na prática ortopédica, sendo a condição inicial para o desenvolvimento de pseudoartroses, que são responsáveis por alta morbidade, pois nem sempre se observa sua reparação. O uso de enxertos ósseos tem auxiliado os cirurgiões na tentativa de reestabelecer a fisiologia óssea normal dos pacientes. Porém, nem sempre são efetivos, devido a pouca quantidade obtida, grande morbidade ao doador, e possíveis reações imunológicas que podem levar ao retardo e insucesso da técnica. Assim, surge a necessidade de encontrar uma alternativa que contribua para uma consolidação óssea que cause menos danos ao animal e uma rápida recuperação após a fratura. Acreditamos que os efeitos da hidroclorotiazida possa acelerar o processo cicatrização óssea. Se comprovada sua eficiência, essa droga pode se tornar mais um método a ser empregado no auxílio da reparação dos tecidos ósseos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho será o de verificar a atuação da hidroclorotiazida no processo de regeneração óssea após lesão por escareação na tíbia de ratas Wistars.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar através de análise histológica os efeitos da hidroclorotiazida na regeneração óssea entre os grupos controle e grupo tratamento;
- ✓ Determinar a concentração plasmática do íon Cálcio (Ca^{2+}) entre os grupos controle e tratamento.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 O Tecido Ósseo

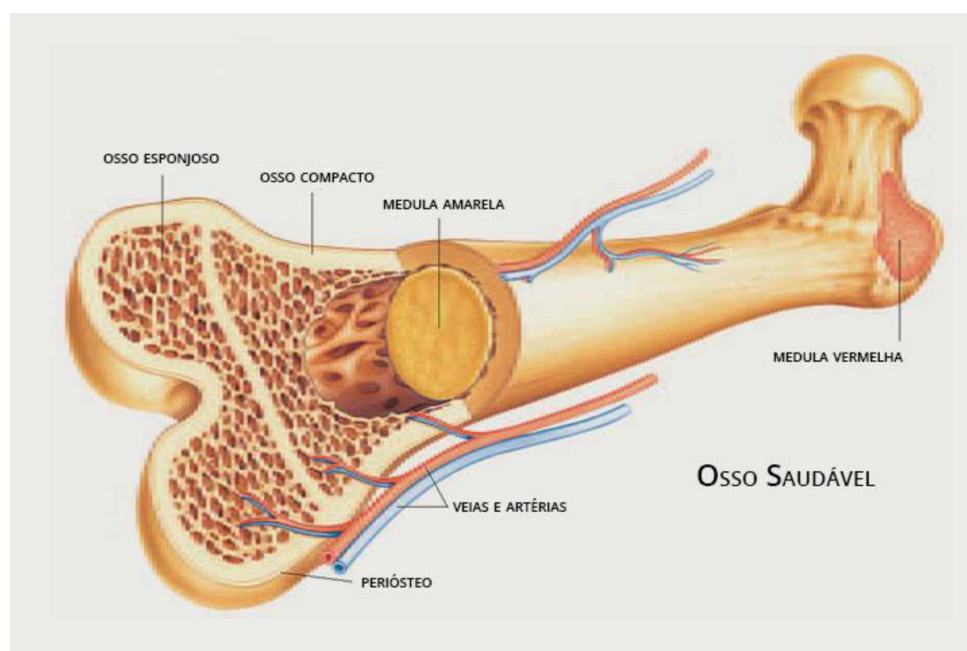
O sistema esquelético é dividido em esqueleto axial, que compreende crânio, coluna vertebral, costelas e esterno, e o esqueleto apendicular, que é dividido em cingulos do membro superior, inferior, com braços e pernas. Na composição do esqueleto ósseo, existem quatro tipos de ossos, que são caracterizados como: longos, curtos, planos e irregulares. O sistema ósseo constitui a maioria das estruturas no sistema esquelético, e o esqueleto representa aproximadamente 20% do peso total corporal (HAMILL; KNUTZEN, 2012).

O tecido osso se compõe basicamente de substância mineral, na forma de hidroxiapatita de cálcio, e por colágeno do tipo I numa substância fundamental de glicosaminoglicanos. A matriz colagenosa é conhecida como osteóide (essa matriz é produzida pelo principal tipo celular do osso, o osteoblasto (uma célula que reveste as superfícies formadoras de tecido ósseo. Mais tarde, essas células terminam encarceradas no interior da matriz e passam a chamar-se osteócitos (JONES et al., 2000).

Na sua formação o osso se desenvolve por substituição de um tecido conjuntivo preexistente. Os dois processos de formação do osso ou osteogênese observados no embrião são: 1 (ossificação intramembranosa, na qual o tecido ósseo é depositado diretamente no tecido conjuntivo primitivo ou mesênquimal) e 2 (ossificação endocondral, na qual o tecido ósseo substitui uma cartilagem hialina preexistente, o molde do futuro osso (KIERSENBAUM, 2004).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode se apresentar como compacto, na região mais periférica dos ossos, denominada cortical, e esponjoso ou trabecular, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea (figura 1). As superfícies ósseas internas e externas são revestidas respectivamente pelo endóstio e perióstio. O perióstio constitui membrana de grande importância para a integridade dos ossos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

Figura 1 – O tecido ósseo e suas estruturas.



Fonte: (DYCE et al., 2004).

O tecido ósseo é um tecido que exerce variadas funções no organismo vertebrado, atua na proteção e suporte dos tecidos moles, protegem órgãos, ancoram e apoiam músculos e participa como moradia para a medula óssea na produção de células sanguíneas. É um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado (STEVENS; LOWE, 2001; PORTINHO et al., 2008; FEITOSA, 2008).

O osso é um tecido dinâmico, complexo, influenciado por fatores fisiológicos, nutricionais e físicos, como estresse mecânico e atividades físicas. Para atender às necessidades de crescimento do organismo os ossos sofrem processo de modelagem, que representa o alongamento longitudinal e do diâmetro. Há uma variação individual e específica do crescimento de cada osso cujo controle se dá sobre a físe, isto é, cada cartilagem de conjugação tem uma taxa específica de crescimento, em que o controle é geralmente hereditário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O osso está estreitamente relacionado com o desenvolvimento do animal, sofrendo adaptações frequentes quanto à sua constituição, podendo estar hipertrofiado quando é mais exigido, ou atrofiado quando em desuso. Serve de reserva metabólica de cálcio e fósforo no organismo, os quais podem ser mobilizados durante alterações da homeostase (MACARI et al., 2002).

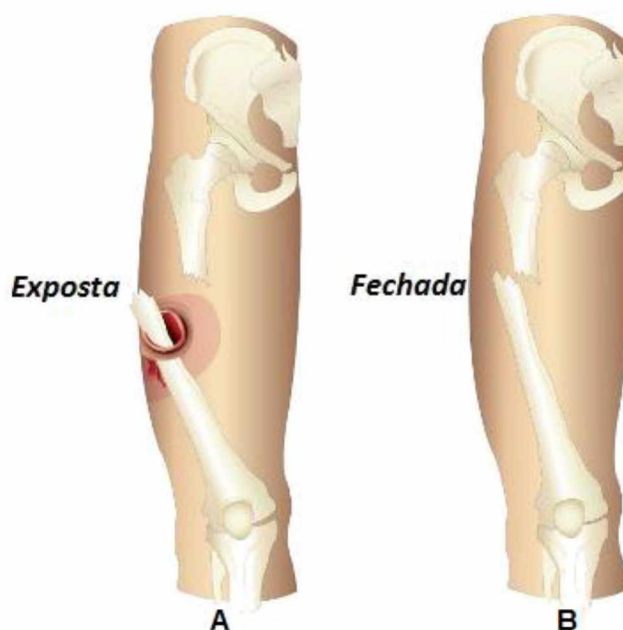
O tecido ósseo constitui um notável material de construção, de natureza biológica, com a singular capacidade de edificar estruturas muito resistentes que se remodelam e reparam a si próprias (FALONI, 2006).

4.2 Fraturas Ósseas

Em uma análise mecânica, fratura representa a perda da capacidade óssea de transmitir dentro da normalidade a carga durante o movimento, causada pela perda da integridade da estrutura esquelética (HAMILL; KNUTZEN, 2012).

As fraturas são classificadas como fechadas/interna e ou aberta/expostas. Na fratura fechada (figura 2b) pode haver pouco ou nenhum movimento ou deslocamento dos ossos quebrados sem penetração no tecido superficial. No entanto, na fratura exposta (figura 2a), há deslocamento de extremidades fraturadas com o osso penetrando nos tecidos que circundam o local, inclusive na pele, que fica lacerada. Os dois tipos de fratura podem ser graves se não forem tratados adequadamente. Os sinais e sintomas são deformidade, sensibilidade pontual, edema e dor durante os movimentos ativos e passivos (SLATTER, 1998; PRENTICE, 2012).

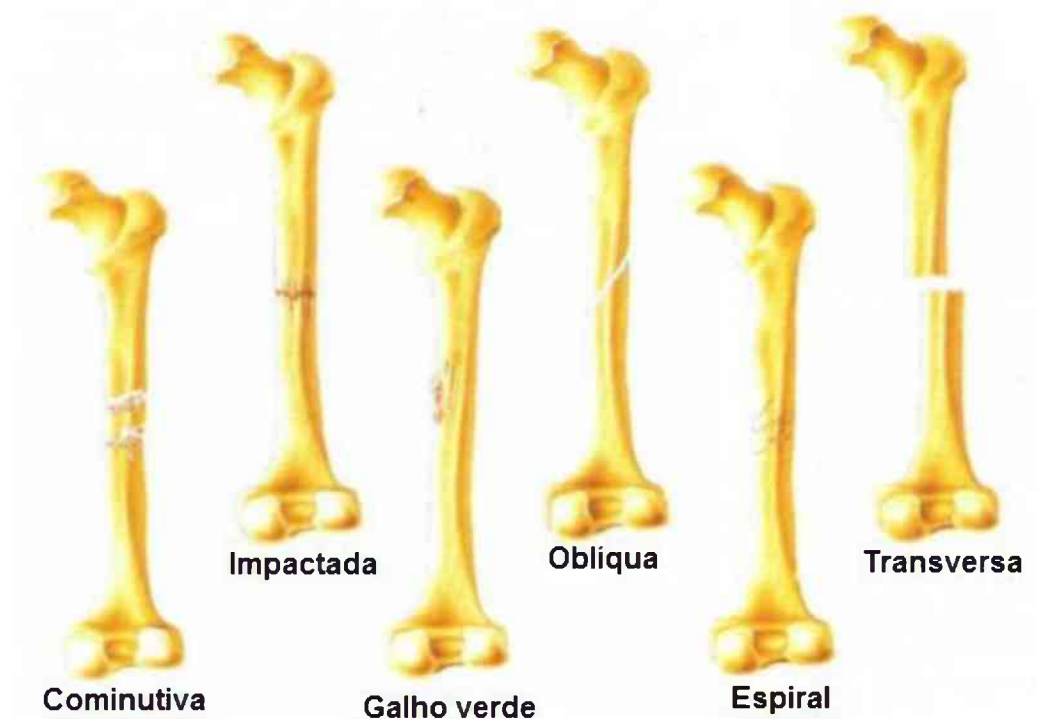
Figura 2 – Desenho representativo de fratura fechada e fratura exposta.



Fonte: adaptado (MACHADO, 2014).

De acordo com Jones et al. (2000), ainda existem mais 6 tipos de fraturas: fratura transversa (quando o traço de fratura atravessa o osso numa linha mais ou menos reta); fratura cominutiva (quando existem muitas partes fraturadas); fraturas impactada (raramente ocorre, mas neste tipo de fratura um fragmento ósseo se projeta forçadamente para dentro de outro osso); fratura em galho verde (quando o periósteo permanece intacto e mantém no lugar as extremidades do osso); fratura por tensão (quando o osso se encontra sob repetida tensão, aumenta a atividade de remodelagem – que possivelmente está direcionada para o reparo das micro lesões. Quando a tensão continua, formam-se os calos periosteais e endosteais, que ajudam a fortalecer o osso, ao mesmo tempo que ocorre a remodelagem ativa) e por último, fratura patológica (fratura que ocorre não como resultado de qualquer traumatismo pouco habitual, mas porque o osso sofreu debilitação precedente por alguma outra moléstia, como exemplo cita-se a distrofia fibrosa, ou tumores ósseos) (figura 3).

Figura 3 – Tipos de fraturas dos ossos.



Fonte: adaptado (BIOSOM, 2017).

Dentre as complicações mais comuns destacam-se, a não união óssea, a união retardada e a pseudoartrose. Ambas levam a desvios e inadequação óssea, comprometendo a deambulação do animal (PRENTICE, 2012).

4.3 Reparo das Fraturas

Os eventos envolvidos no processo de reparação óssea são de extrema complexidade, pois incluem uma série de eventos interagindo em prol da cura do osso; esses eventos são: síntese de gene, atividade de grande quantidade de células e proteínas, atuando na restauração da integridade do tecido ósseo para a restauração das extremidades envolvidas na fratura (OLIVEIRA et al., 2011).

Ainda de acordo com Oliveira et al. (2011), a reconstrução de grandes defeitos ósseos continua sendo um dos desafios da engenharia de tecidos. Na tentativa de reparar defeitos ósseos, novas abordagens propõem a utilização de medicamentos e ou agentes bioativos que favoreçam a sua remodelação em períodos de tempo mais curtos.

As fases de recuperação necessitam das chamadas “moléculas sinalizadoras”, que regulam a atividade e diferenciação das diversas células envolvidas. Essas moléculas, basicamente são o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), citocinas (interleucina-1, ou IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral – TNF α), metaloproteinases, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e angiopoietina (DIMITRIOU et al., 2005).

Alguns fatores podem atrasar ou mesmo impedir a união dos fragmentos ósseos, como a severidade e a localização da fratura, a natureza do suprimento sanguíneo para o osso, a extensão da lesão em tecidos moles, perda óssea, contato com o ar e contaminação, ou mesmo presença de tumor. Outros fatores sistêmicos podem estar envolvidos, como alcoolismo, fumo, idade e diabetes (HADJIARGYROU et al., 1998).

4.4 Hidroclorotiazida

Os diuréticos tiazídicos foram os primeiros anti-hipertensivos disponíveis para uso em larga escala. Lançados em meados dos anos 50 continuam a ser administrados, isolados ou em associação, a milhões de hipertensos em todo o mundo. Foi com esta classe de drogas que se demonstrou redução da morbimortalidade com o tratamento anti-hipertensivo.

Atua sobre o mecanismo tubular renal de absorção de eletrólitos, aumenta a excreção urinária de sódio e água por inibição da reabsorção de sódio no princípio dos túbulos distais e aumenta a excreção urinária de potássio incrementando a secreção de potássio no túbulo contornado distal e em tubos coletores. Absorve-se com relativa rapidez após sua administração oral. Sua meia-vida normal é de 15 horas, o efeito diurético começa após 2 horas, o efeito máximo é obtido após 4 horas e sua ação dura de 6 a 12 horas. Elimina-se por via renal de forma inalterada (SPINOSA et al., 2006).

Ainda de acordo com Spinosa et al. (2006), suas indicações estão empregadas no tratamento de diversas doenças como: edema associado com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática com ascite, síndrome nefrótica, glomerulonefrite aguda e insuficiência renal crônica e hipertensão (HUNGRIA, 2007).

Além disso, a hidroclorotiazida diminui a excreção de cálcio pelos rins, contribuindo positivamente com a densidade mineral óssea e com a diminuição do risco de fraturas (AUNG, HTAY, 2011). Segundo Bokrantz et al. (2016) o tratamento com tiazidas em pacientes hipertensivos diminuiu o risco de fratura relacionadas a osteoporose. Estudos sugerem que o aumento da densidade mineral óssea não está diretamente relacionado ao aumento do transporte de cálcio tubular renal, mas a uma ação direta no osso onde as tiazida podem exercer seu efeito através da inibição da reabsorção óssea mediada por osteoclastos e/ou reforço da atividade dos osteoblastos.

De acordo com Bolland et al. (2007) a hidroclorotiazida mostra-se benéfica em relação a densidade mineral óssea em mulheres em idade pós-menopausa, prevenindo a perda óssea que ocorria principalmente em pacientes com histórico de hipertensão e cálculo renal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Inicialmente este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aprovado sob número de protocolo Nº 014/16 (anexo I).

Foram utilizadas 24 ratas, (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), com peso médio de 230g e idade aproximada de 10 semanas, adquiridos junto à Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da UFU.

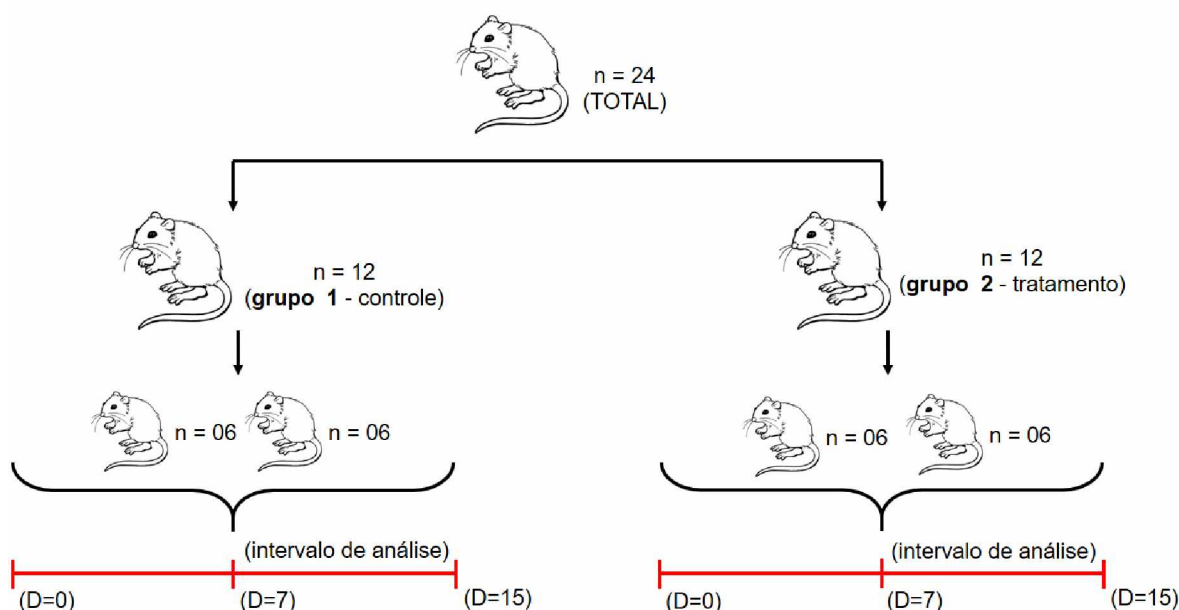
Os animais foram mantidos na Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) também da UFU em gaiolas apropriadas, condicionadas em estantes climatizadas a temperatura de 22°C, forradas com maravalha recebendo água e ração *ad libitum*. Cada gaiola alojou seis animais. Os animais passaram por um período de ambientação desde o seu nascimento, até serem submetidos ao procedimento de experimentação.

5.2 Grupos Experimentais

Após a cirurgia, os animais foram divididos em dois grupos com 12 animais cada (figura 4), sendo o grupo I o controle e o grupo II submetido ao tratamento com hidroclorotiazida, como mostrado a seguir:

- ✓ **O grupo I - GRUPO CONTROLE:** submetidos a osteotomia, receberam carboximetilcelulose (veículo usado para diluição das drogas) por via oral, duas horas após a lesão, até o dia da eutanásia. Este grupo foi subdividido em dois subgrupos de seis animais cada, analisados aos 7 e 15 dias de pós-operatório.
- ✓ **O grupo II - GRUPO HIDROCLOROTIAZIDA:** submetido a osteotomia, receberam 15 mg/kg dia de hidroclorotiazida por via oral, 24 horas após a lesão, até o dia da eutanásia. Este grupo também foi subdividido em 02 subgrupos de 06 animais cada, analisados aos 7 e 15 dias de pós-operatório.

Figura 4 – Fluxograma de distribuição dos grupos controle e tratamento.



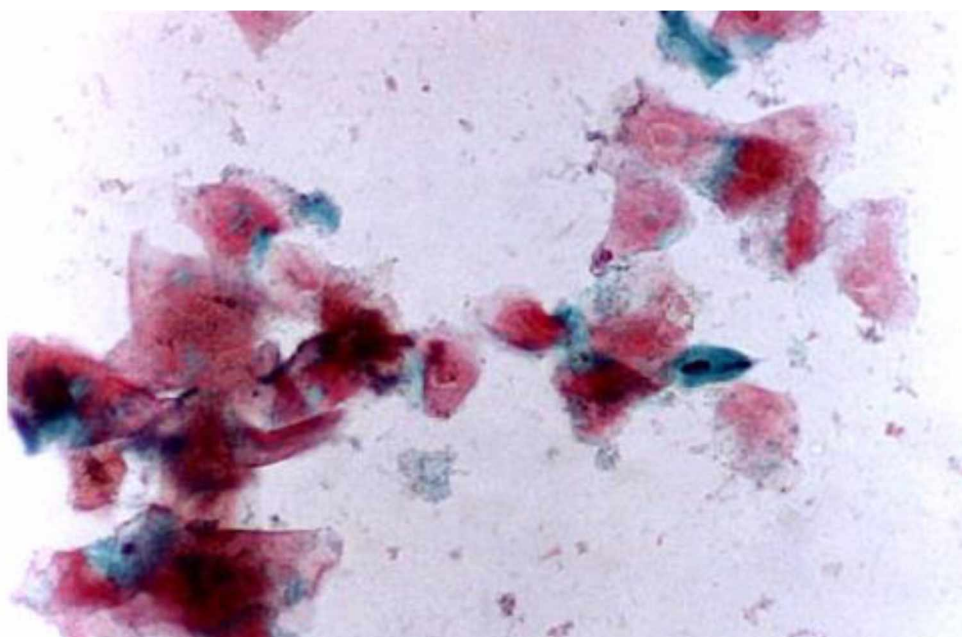
5. 3 Preparações do Veículo e Medicamento

Ambos a carboximetilcelulose e a hidroclorotiazida foram adquiridas de uma farmácia de manipulação de medicamentos veterinários da cidade de Uberlândia, MG, Brasil. Suspensões de hidroclorotiazida na dose de (15mg/mL) foram preparadas imediatamente antes das administrações utilizando-se como veículo carboximetilcelulose na concentração de (5%).

5.4 Procedimento Cirúrgico

Por se utilizar fêmeas no modelo experimental, tomou-se o cuidado para padronizar as lesões ósseas, realizando o procedimento cirúrgico sempre na mesma fase estral (estro/cio). Para identificação do ciclo estral, os animais foram submetidos a um lavado vaginal, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de 3 mL, foi injetado aproximadamente 0,5 mL de solução salina 0,9% no canal vaginal, e aspirado em seguida, posteriormente realizou-se com essa solução extensão em lâmina (figura 5) para visualização ao microscópio nas objetivas de 10 e 40x. Ainda de acordo com o mesmo autor (figura 5) ilustra um lavado vaginal de rata para determinação do ciclo estral (VILELA et al., 2007)

Figura 5 – Extensão de citologia vaginal de ratas em período de estro.



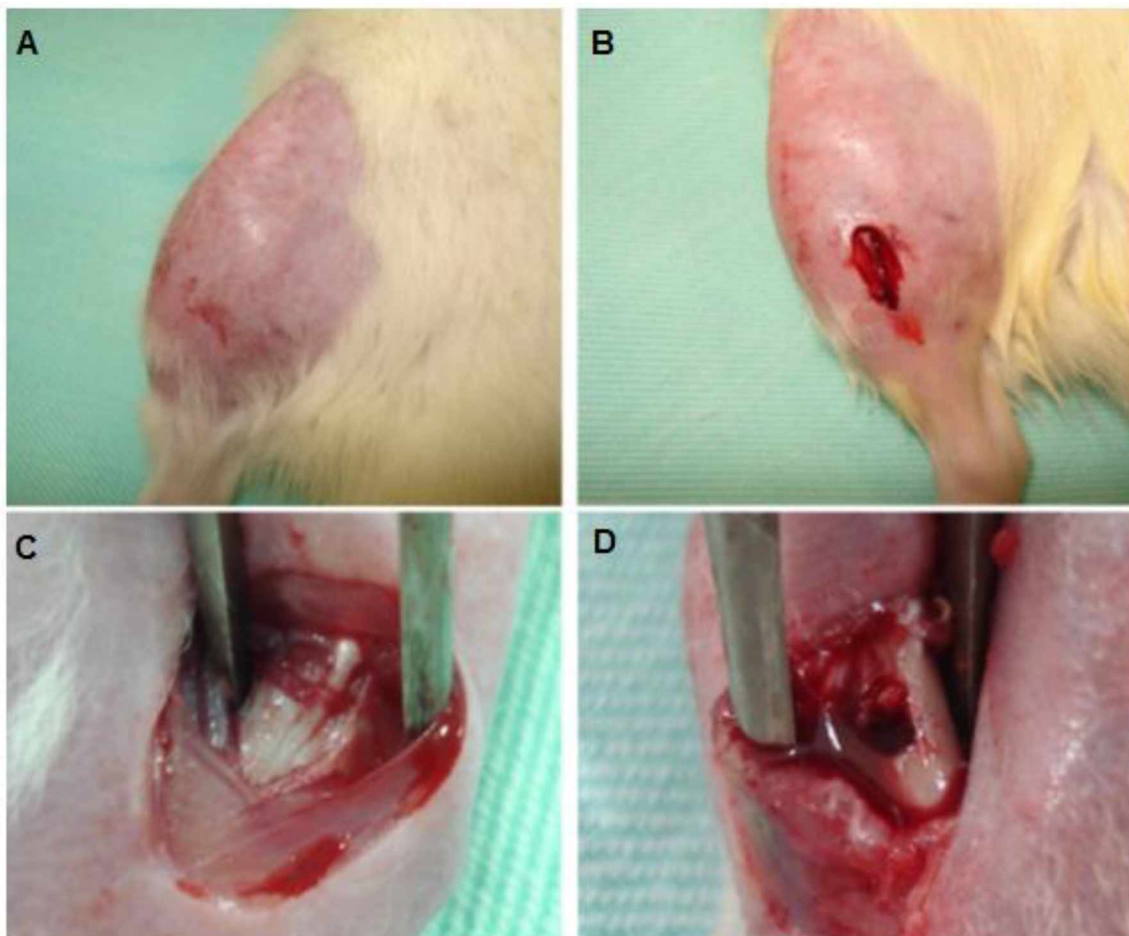
Legenda: Fotomicrografia de conteúdo vaginal obtido através de extensão em lâmina de rata como comparativo para confirmação da fase de estro, representado por células superficiais, com aspecto orangiófilo e anucleadas, poucas células nucleadas e ausência de polimorfonucleares coradas pelo método de Ginsa.

Fonte: adaptado (VILELA et al., 2007).

Os animais foram anestesiados com protocolo de associação entre cloridrato de quetamina 10% (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg), aplicados por via intramuscular. Após 10 minutos da aplicação da anestesia, os animais sofreram tricotomia da região medial da perna, incluindo a articulação do joelho, no membro pélvico direito (figura 6A). Com o animal em decúbito dorsal, foi feita anti-sepsia com polivinilpirrolidona 2% seguido de álcool-iodado 3%.

Verificada a presença de analgesia (pinçamento de cauda e dos espaços interdigitais), foi feita uma incisão longitudinal de pele, na face medial da perna sob a região proximal da tíbia (figura 6B). A musculatura nesta região foi afastada com o auxílio de pinças anatômicas, de modo a expor a porção proximal da tíbia (figura 6C). Em seguida, uma falha óssea de 2mm de diâmetro com profundidade bicortical foi criada de aproximadamente 8 mm distal a articulação do joelho (figura 6D), em ambos os membros pélvicos, com o auxílio de uma broca de 2mm acoplada a uma mini retífica de baixa rotação marca Wester®, com irrigação constante de solução fisiológica para evitar superaquecimento do tecido ósseo.

Figura 6 – Etapas cirúrgicas para realização da lesão óssea, na metáfise proximal da tíbia de ratas.



Legenda: (A) Tricotomia da região medial da articulação femoro-tíbia-patelar; (B) Acesso cirúrgico cutâneo na face medial da perna, na região proximal da tíbia; (C) Afastamento da pele, tecido cutâneo e periósteo para a exposição da região proximal da tíbia; e (D) Lesão óssea circular de 2mm de diâmetro com profundidade bicortical na região proximal da tíbia.

Após inspeção da região osteotomizada e das partes moles adjacentes, foi realizada a limpeza da área com solução fisiológica para remoção dos detritos. A pele juntamente com a musculatura foi aproximada com pontos tipo simples separado de fio de nylon n° 3-0.

5.5 Administração dos fármacos em estudo

Após duas horas do término da cirurgia (tempo aguardado para que o animal se recuperasse da anestesia) iniciou-se a administração dos fármacos (carboximetilcelulose e hidroclorotiazida) em estudo de acordo com os grupos

experimentais estabelecidos, através de gavagem (figura 7), e repetidos a cada 24 horas, até o dia da eutanásia dos animais.

Figura 7 – Administração dos fármacos pelo método de gavagem em um dos animais do experimento.



5.6 Análise da Concentração Plasmática de Cálcio (Ca^{2+})

No final dos respectivos dias de observação todos os animais de ambos os grupos foram novamente anestesiados com o mesmo protocolo citado para o procedimento cirúrgico e submetidos a colheita de sangue para dosagem sérica de cálcio. Foram coletados 0,5 mL de sangue por punção cardíaca, através de toracotomia pela técnica de esternotomia mediana, com uma seringa de vidro contendo 60 unidades internacionais (UI) de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e depois armazenado em tubo VACUNTAINER® com gel separador.

Após o procedimento o sangue foi centrifugado em velocidade de 4.000 rotações por minuto (RPM), durante cinco minutos afim de separar e coletar o plasma para armazenamento em frascos de ependorfes e congelados a -8°C até serem encaminhados para um laboratório de análises clínicas para mensuração da concentração de Ca^{2+} método de Arsenazo III.

5.4 Eutanásia

Os animais de ambos os grupos foram submetidos à eutanásia no final dos respectivos dias de observação (7 e 15 dias de pós-operatório), com sobre dose de Tiopental Sódico por via intraperitoneal e após sedação submetidos a técnica de deslocamento cervical, conforme recomendado pela resolução 1000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre métodos de eutanásia para animais de laboratório e ou experimentação (CFMV, 2012).

Após a eutanásia os animais tiveram suas tíbias dissecadas e desarticuladas proximalmente à articulação do joelho e distalmente a articulação társica e em seguida, fixadas em formol para análise histológica e histomorfométrica.

5.5 Análise Histológica e Histomorfométrica

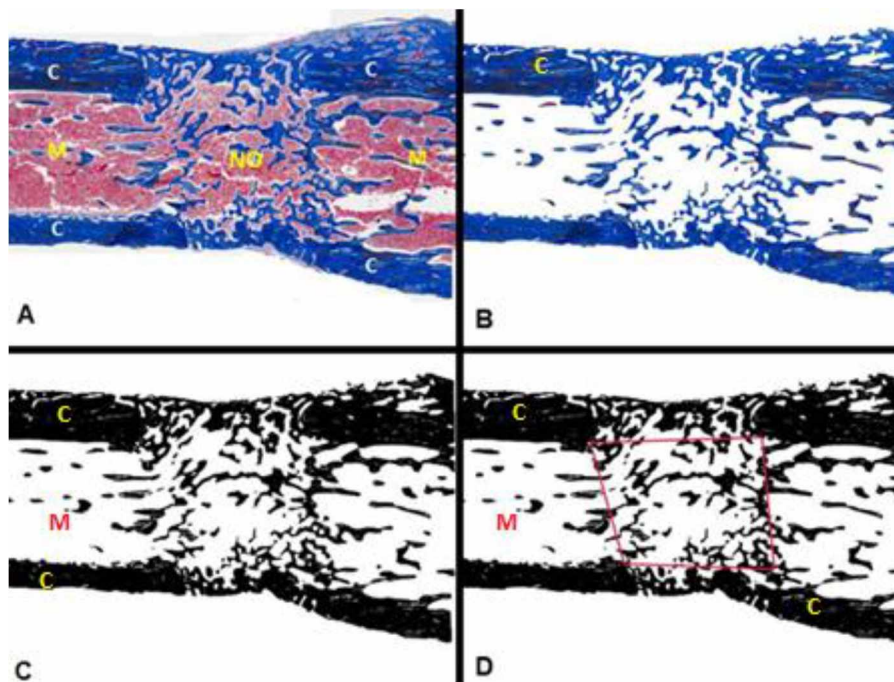
Após a fixação em formol 10%, as peças foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (solução contendo 4,13% de EDTA e 0,4% de hidróxido de sódio) por 25 dias. Posteriormente, foram hemiseccionadas no sentido longitudinal na região central da falha óssea. Cada fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em um bloco de parafina e submetido a técnica histológica de rotina. Foram confeccionados cortes seriados de cada bloco, com cinco micrômetro de espessura, corados com hematoxilina eosina (HE) e Tricômico de Mallory no qual a primeira foi usada para análise histológica qualitativa e a segunda para análise histomorfométrica.

A análise histológica qualitativa avaliou os aspectos morfológicos do reparo ósseo na área da lesão, observando a presença de coágulo, de células inflamatórias e de tecido de granulação, tipo de tecido ósseo, morfologia das células ósseas e a organização e a espessura das trabéculas ósseas.

Na análise histomorfométrica foi quantificada a proporção de preenchimento ósseo dentro do defeito realizado. As lâminas foram digitalizadas utilizando scanner modelo ScanScope AT Turbo® (LeicaBiosystemsNussloch, Shinjuku-ku, Nußloch/Alemanha) e analisadas utilizando o programa de imagem Aperio Image Scope® (Aperio Technologies, Inc. 2003-20013, Version

12.1.0.5029), com aumento de 4x. Cada fotomicrografia foi obtida através da união das imagens de cada defeito ósseo com o software editor de imagens Adobe Photoshop CS6 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA). Esse mesmo software também foi utilizado para remover toda área de tecido mole da fotomicrografia. Através do software gráfico HL Image 97 ++ (Western Vision Software, Utah/EUA), as imagens de cada lâmina fotografada e editada foram transformadas em imagens binárias e em seguida a região de cada defeito foi delimitada em quatro linhas, estendendo-se das bordas inferiores da cortical óssea lesionada até a cortical oposta através da ferramenta draw. Os dados de interesse foram os valores referentes a porcentagem de matriz, fornecidos em pixels, que foram calculadas com a ferramenta *measurement* (figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografia de secção longitudinal da tíbia dos animais do grupo 2.



Legenda: (A) secção longitudinal da tíbia mostrando cortical óssea [C], medula óssea [M], neoformação óssea [NO]; (B) fotomicrografia após remoção de tecido mole ósseo; (C) imagem binária; e (D) delimitação da região de interesse [quadrilátero vermelho]. Tricrômico de Mallory 4x.

5.7 Análise Estatística

Todos os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para verificação de sua normalidade. O pós-teste de

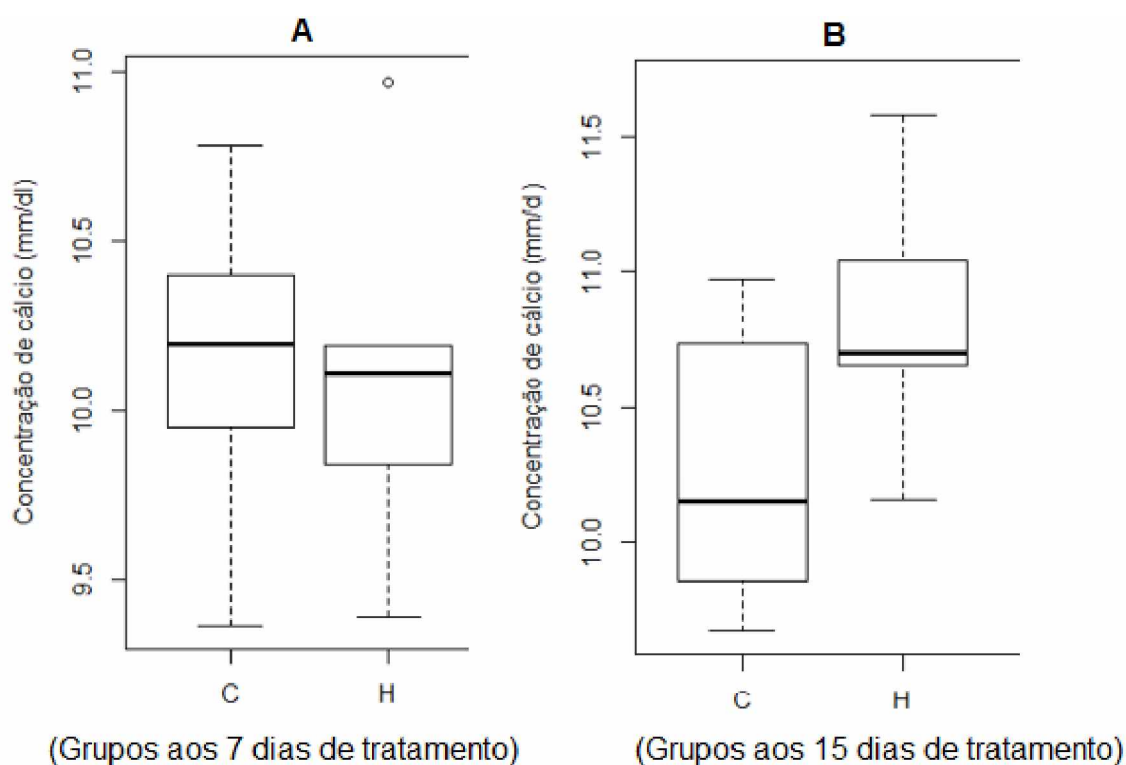
Newman-Keuls foi utilizado para análise entre os grupos experimentais com mais de dois tratamentos, sendo o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Toda a análise estatística foi realizada pelo programa R 3.1.2 (R Development Core Team 2014).

6. RESULTADOS

6.1 Concentração Plasmática de Ca^{2+}

Todos os animais de ambos os grupos avaliados aos sete dias de pós-operatório não apresentaram diferenças significativas em relação à concentração plasmática do íon Ca^{2+} ($F = 0,46$; $GL = 23$; $SIG = 0,716$) (figura 9A). Os animais analisados aos quinze dias também não apresentaram diferenças significativas para o mesmo teste ($F = 1,741$; $GL = 23$; $SIG = 0,191$) (figura 9B).

Figura 9 – Concentração plasmática de Ca^{2+} entre os grupos controle e tratamento hidroclorotiazida aos sete e quinze dias de tratamento.



Legenda: (A) Grupos tratados aos setes dias [C] controle, [H] tratamento com hidroclorotiazida; (B) Grupos tratados aos quinze dias [C] controle, [H] tratamento com hidroclorotiazida (Teste Newman-Keuls).

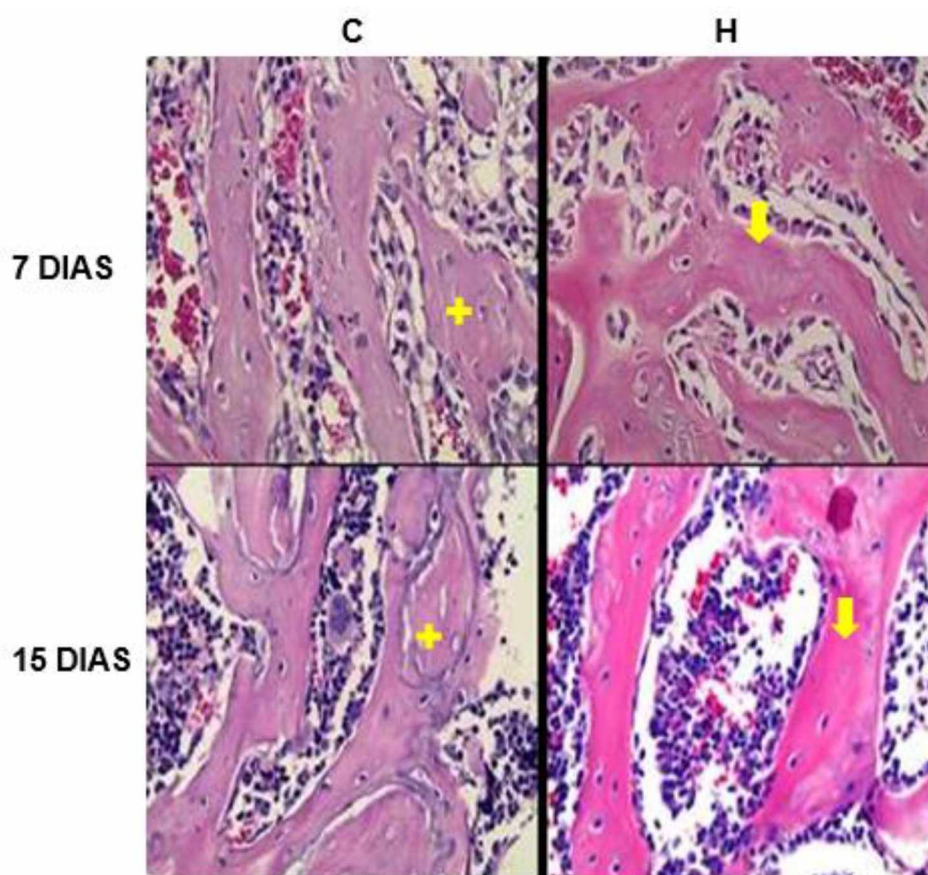
6.2 Análise Histológica

Em ambos os dois grupos analisados para o período de sete dias, os cortes histológicos revelaram área da lesão óssea apresentando focos de hemorragia e debris de matriz óssea originados durante o procedimento cirúrgico. A área da lesão óssea apresentava-se parcialmente preenchida por trabéculas ósseas constituídas por tecido ósseo primário.

Essas trabéculas preenchiam o espaço do canal medular não apenas na área da lesão, mas se estendiam além dessa área no interior do canal medular. Além disso, encontravam-se permeadas por tecido de granulação ricamente celularizado. A matriz óssea possuía vários osteócitos no interior de lacunas e de aspectos usuais. Observaram-se inúmeros osteoblastos volumosos, com núcleo excêntrico de cromatina mais frouxa e citoplasma basofílico. Tais características morfológicas são compatíveis com alta atividade sintética. Inúmeros desses osteoblastos ativos revestiam a superfície da matriz óssea e muitos deles estavam associados à matriz osteóide, que foi observada em áreas relativamente extensas. Foram observados poucos osteoclastos na área da lesão óssea. Não foi observado infiltrado inflamatório em nenhum espécime (figura 9).

Já para o período de 15 dias, os cortes histológicos dos grupos analisados revelaram área da lesão óssea em ambas corticais totalmente preenchidas por trabéculas ósseas constituídas por tecido ósseo primário. Essas trabéculas também preenchiam a área do canal medular e se estendiam além da área da lesão. No entanto, essas trabéculas estavam permeadas por medula óssea e não por tecido de granulação. Apresentavam osteócitos no interior de lacunas e estavam revestidas por osteoblastos de morfologia variada. Alguns desses osteoblastos exibiam aspecto de células ativas e estavam associados à matriz osteóide. Foram encontrados alguns osteoclastos localizados em lacunas de Howship na matriz óssea o que indica atividade de reabsorção óssea (figura 10)

Figura 10 – Fotomicrografia de seção longitudinal de tíbia, aos sete e quinze dias de tratamento.



Legenda: (C) Grupo Controle; (H) Grupo tratamento Hidroclorotiazida. Nota-se área com formação de tecido ósseo primário representado pelo símbolo (+) em amarelo e áreas formadas com matriz óssea secundária indicadas pelas setas também em amarelo. Coloração com HE, ampliação de 40x.

Foram observados como mostrado na (figura 9) maiores quantidades da área preenchida por tecido de granulação. Além disso, notou-se menor quantidade de hemácias extravasadas e áreas de reorganização da medula óssea.

No (quadro 1) nota-se que aos 7 dias de tratamento, a maioria dos animais haviam desenvolvido reparo ósseo primário, sendo 6 (100%) dos animais no grupo controle, ao passo que para o grupo tratamento 5 (83,33%) também apresentavam reparo ósseo do mesmo tipo. Através desta análise, fica evidente que aos 7 dias de tratamento não houve interferência da hidroclorotiazida sob a formação de tecido ósseo secundário.

Quadro 1 – Estágio do reparo ósseo nos grupos tratados: controle (carboximetilcelulose) e grupo tratamento (hidroclorotiazida) aos 7 dias do procedimento cirúrgico.

Estágio do reparo ósseo	Controle (carboximetilcelulose)	Tratamento (hidroclorotiazida)	Total
Inicial	6 (100%)	5 (83,33%)	11 (91,67%)
Avançado	0 (0%)	1 (16,67%)	1 (8,33%)
Total	6	6	12

Não houve diferença significativa no estágio do reparo ósseo entre os grupos ($p=1,0$). Teste exato de Fisher.

Em 01 (16,67%) animal do grupo controle (carboximetilcelulose) e em 06 (100%) animais do grupo tratamento (hidroclorotiazida) aos 15 dias de tratamento, foram observados na área da lesão algumas trabéculas ósseas constituídas por tecido ósseo secundário (quadro 2). Estes achados, comprovam a ocorrência do processo de remodelação óssea com substituição do tecido ósseo primário, evolução natural do processo de reparo ósseo. Evidenciando portanto, que aos 15 dias de tratamento com hidroclorotiazida a formação de tecido ósseo secundário se mostrou mais evidente.

Quadro 2 – Estágio do reparo ósseo nos grupos tratados: controle (carboximetilcelulose) e grupo tratamento (hidroclorotiazida) aos 15 dias do procedimento cirúrgico.

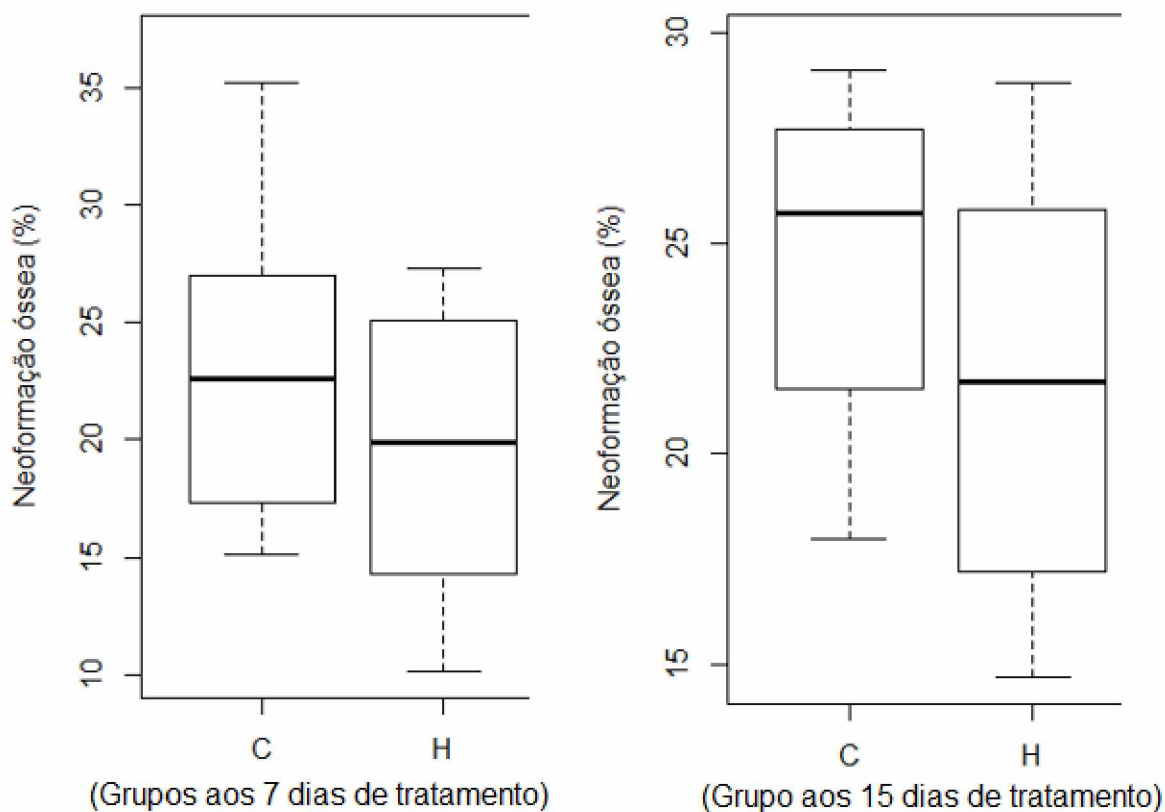
Estágio do reparo ósseo	Controle (carboximetilcelulose)	Tratamento (hidroclorotiazida)	Total
Inicial	5 (83,33%)	0 (0%)	5 (41,67%)
Avançado	1 (16,67%)	6 (100%)	7 (58,33%)
Total	6	6	12

A frequência de aparecimento do tecido ósseo secundário no grupo tratado com hidroclorotiazida foi maior do que aquela apresentada pelo grupo controle ($p=0,08$). Teste exato de Fisher.

6.3 Análise Histomorfométrica

O percentual de neoformação óssea não apresentou diferença significativa quando comparados os grupos tratados aos sete dias após o procedimento cirúrgico ($F = 2,337$; $GL = 21$; $SIG = 0,108$) (figura 11A). Os grupos tratados por quinze dias também não tiveram resultados com diferenças significativas para a análise histomorfométrica ($F = 0,236$; $GL = 18$; $SIG = 0,870$) (figura 11B).

Figura 11 – Porcentagem de neoformação óssea entre os grupos controle e tratamento hidroclorotiazida aos sete e quinze dias de tratamento.



Legenda: (A) Grupos tratados aos setes dias [C] controle, [H] tratamento com hidroclorotiazida; (B) Grupos tratados aos quinze dias [C] controle, [H] tratamento com hidroclorotiazida (Teste Newman-Keuls).

7. DISCUSSÃO

O entendimento dos tipos de fraturas é fator importante para o tratamento, pois tem por objetivo uma melhor orientação quanto ao plano de tratamento, deve permitir um prognóstico, e serve de parâmetro para a comparação dos resultados obtidos no tratamento (BENTO et al., 2011).

Ratos da linhagem Wistar foi o modelo experimental usados nesta pesquisa por se tratar de uma das espécies mais utilizadas em trabalhos relacionados ao tratamento de fraturas ósseas (PRADO et al., 2006). Além disso, é um animal dócil, o que favorece o acompanhamento das lesões sem necessidade de imobilização (LI et al, 1990; MAEDA, 1993; OTTO, 1995).

Optou-se por trabalhar com fêmeas pois estas são mais dóceis que animais machos e pela facilidade de obtenção, visto que na maioria dos biotérios estas são descartadas. No entanto as ratas apresentam diferentes fases em seu ciclo estral com concentrações variadas de estradiol, hormônio diretamente ligado à osteogênese (COMPSTON, 2001). Por este motivo foi realizado a padronização do ciclo estral, através da citologia vaginal demonstrou ser uma técnica rápida, prática e de fácil execução, o que permitiu que todos os procedimentos cirúrgicos fossem realizados no estro, diminuindo uma possível variável (VILELA et al., 2007).

O protocolo anestésico utilizado no trabalho mostrou-se eficiente para a realização da osteotomia na porção proximal da tíbia. A associação dos anestésicos cloridado de quetamina 10% (0,2 ml/kg) e cloridado de xilazina 2% (0,07 ml/kg), aplicados por via intraperitoneal mostrou-se efetivo, permitindo todas as intervenções no animal, com uma boa margem de segurança, não havendo perda de nenhum animal no trans e pós-cirúrgico. A técnica utilizada para a realização da osteotomia foi à mesma descrita por Marino (2003) e Lirani-Galvão (2006). Que promove lesões ósseas esféricas de dimensões padronizadas, na cortical da tíbia de ratos, sendo uma técnica de fácil execução.

A concentração plasmática de cálcio não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos deste experimento, tanto no período de sete, quanto no de quinze dias de tratamento após a cirurgia. Não há relatos na literatura sobre a ação da hidroclorotiazida nos processos de reparação óssea,

apesar da hidroclorotiazida diminuir a excreção de cálcio pelos rins (AUNG; HTAY, 2011).

No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre as fêmeas tratadas com hidroclorotiazida e o grupo controle em relação à concentração de cálcio no plasma, resultados semelhantes ao descrito por Runyan et al. (2005), que mesmo utilizando uma dose maior de medicação (50mg/kg) durante quatro semanas, também não encontrou diferença significativa na concentração plasmática de cálcio.

Os resultados das concentrações plasmáticas de cálcio observados neste trabalho se devem provavelmente ao controle promovido pelo hormônio paratireoideano, que realiza a homeostase em alterações sanguíneas de cálcio superior a 2,4 mmol/L (AMARAL et al., 2014).

O grupo tratamento (hidroclorotiazida) apresentou relevante aumento na frequência de aparecimento de tecido ósseo secundário em relação ao grupo controle. Kang et al. (2013) mostra em seu estudo que os tiazídicos afetam positivamente a densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas. Já Sakis et al. (2012) descreve a ação no osso, dos diuréticos tiazídicos de três maneiras: diminuindo a excreção de cálcio, que resulta numa diminuição da secreção de PTH e diminuição na remodelação óssea; aumentando o bicarbonato sérico o que beneficia o tecido ósseo; ação direta do fármaco estimulando os osteoclastos e inibindo os osteoblastos. Em nosso estudo a hidroclorotiazida promoveu uma melhora direta na recuperação da falha óssea confirmando o potencial osteogênico citado pelos autores.

Como já descrito neste estudo a hidroclorotiazida, é uma droga amplamente utilizadas para controle da hipertensão. Estes fármacos também atuam na reparação óssea, melhorando a densidade mineral óssea (KANG et al 2013). Fato analisado neste estudo isoladamente onde observou-se uma maior tendência a reparação óssea do grupo tratamento se comparado com o controle. Permitindo assim dizer que a hidroclorotiazida causou uma melhora na cicatrização da lesão óssea.

8. CONCLUSÃO

A hidroclorotiazida não favorece maior formação de tecido ósseo primário em comparação ao grupo controle, porém pode observar que o grupo tratado com a Hidroclorotiazida obteve uma maior maturação de tecido ósseo secundário ou permanente em comparação ao grupo controle.

Os animais não apresentaram diferenças significativas para a concentração de cálcio nem para o grupo controle nem para o grupo tratamento.

Como não há na literatura estudos sobre a sua interferência, faz se necessário, maiores estudos para entender como a hidroclorotiazida sofre interferência no remodelamento ósseo.

REFERÊNCIAS

AUNG, K.; HTAY, T. Thiazide diuretics and the risk of hip fracture. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2011. Issue 10. Art. Nº.: CD005185. DOI:10.1002/14651858.CD005185.pub2.

AMARAL, G. G.; DEL CARLO, R. J.; OLIVEIRA, T. T.; LOUZADAM, J. Q.; VALADARES, R. F. D.; RIBEIRO, M. D.; PINTO, A. S. Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonoides em ratas osteoporóticas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.1, n.6, p. 105-110, 2014.

BENTO, N. T.; VIDMR, M. F.; SILVEIRA, M. M. da.; WIBELINGER, L. M. Intervenções fisioterapêuticas no pós-operatório de fratura de fêmur em idosos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 9, n. 27, p. 42-48, 2011.

BIOSON (Brasil). **10 Remédios Caseiros para Tratar a Fratura dos Ossos**. 2017. Disponível em: <<https://biosom.com.br/blog/saude/10-remedios-caseiros-para-tratar-fratura-dos-ossos/>>. Acesso em: 06 abr. 2017.

BOLLAND, M.; AMES, R.; HORNE, A. M.; ORR-WALKER, B. J.; GAMBLE, G. D.; REID, I. R. The effect of treatment with a thiazide diuretic for 4 years on bone density in normal postmenopausal women. **Osteoporosis International**. v. 18, n.9, p. 479-486, 2007.

BOKRANTZ, T.; LJUNGMAN, C.; KAHAN, T.; BOSTROM, K. B.; HASSELSTROM, J.; HJERPE, P.; MELLSTROM, D.; SCHIOLER, L. MANHEM, K. Thiazide diuretics na the risk of osteoporotic fractures in hypertensive patients. Results from the Swedish Primary Care Cardiovascular Database. **Journal of Hypertension**. v.16, n.5, p.188-197, 2016.

CFMV. BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências**. Brasília: Caderno Técnico do CFMV, 2012. 9 p.

COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiology Veterinary**. v.81, n.13, p. 419-447, 2001.

CORMACK, D. H. Tecido Conjuntivo denso, cartilagem, tecido ósseo e articulações. In: **Fundamentos de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2003.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing, **Injury**, v. 36, n. 12, pp. 1392-1404, 2005.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FALONI, A. P. S. **Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno**. 2006; Tese de Mestrado em Ciências, São Paulo, Universidade Federal de São Paulo.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico**. 2. ed. São Paulo - SP: Editora Roca, 2008.

FREIS, E. D. Effects of treatment on mortality in hypertension. Results in patients with diastolic blood pressure averaged 115-129mmHg. **Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents**. JAMA 1967; 202: p.1028-34.

GONÇALVES, R. P.; OLIVÉRIO, L. C. Electrical decalcification of bone. **Mikroskopie**, v.20, p.154-6, 1965.

HADJIARGYROU, M., MCLEOD, K., RYABY, J. P. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound, **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n. 355S, pp. S216-S229, 1998.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K. M. **Bases biomecânicas do movimento humano**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2012.

HUNGRIA, V. T. M. Doença óssea em mieloma múltiplo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.29; n.5; p.60-6. 2007.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000. 1415 p.

JUNQUEIRA E CARNEIRO. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 10 ed. 488 p.

KANG, K. Y.; KANG, Y.; KIM, M. The effects of antihypertensive drugs on bone mineral density in ovariectomized mice. **Journal Korean Medical Science**. v.8, n.1, p. 1139-1144, 2013.

KATCHBURIAN, E, ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. Texto-atlas-correlações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

KAWAMOTO, S.; NAGAOKA, E. The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. **Journal Oral Rehabil**, v. 27, n. 7, p. 587-94, 2000.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular**. 2004. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 654 p.

LI, J; WEBSTER, S. S.; JEE, W. S. Adaptation of cancellous bone to overloading in the adult rat: a single photon absorptiometry and histomorphometry study. **The Anatomical Record**. v.227, n.4 p. 418-426, 1990.

LIRANI-GALVÃO, A. P. Comparative study of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomedicine and laser surgery**. v.24, n.3, p. 735-740, 2006.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 375, 2002.

MACHADO, L. B. (São Paulo). **Conhecimentos Básicos de Primeiros Socorros: Fraturas**. 2014. Manual de Primeiros Socorros - CIPA. Disponível em: <http://www.prefeiturarp.usp.br/pages/cipa/manual_primeiros_socorros.htm>. Acesso em: 11 out. 2016.

MAEDA, H.; KIMMEL, D. B.; RAAB, D.; LANE, N. E. The musculoskeletal response to immobilization and recovery. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.14, n.6, p.153–159, 1993.

MULLER, S. C. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortopedia Brasileira**. V.12, n.4, p.197-204, 2004.

MARINO, J. A. M. **Efeito do laser de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tíbia de rato**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de São Carlos. 107f. 2003.

OLIVEIRA, P.; SPERANDIO, E.; FERNANDES, K. R.; CAMPOS, F. A.; NONAKA, O.; RENNO, A. C. M. Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em tíbia de rato. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, São Carlos, v. 15, n. 3, p. 200-205, 2011.

OTTO, T. E.; PATKA, P.; HAARMAN, H. J. Closed fracture healing: a rat model. **European Surgery Research**. v. 27, p. 277-284, 1995.

PRENTICE, W. E. **Fisioterapia na prática esportiva uma abordagem baseada em competências**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

RUNYAN, A. L.; CHHOKR, V. S.; SUN, Y.; BHATTACHARYA, S. K.; RUNYAN, J. W.; WEBER, K. T. Bone loss in rats with aldosteronism. **American Journal of the Medical Sciences**, v.1, n.4, p.1-7, 2005.

SARKIS, K. O.; PINHEIRO, M. M.; SEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. High bone density and bone health. **Endocrinología Y Nutrición**. v. 59, n.4, p. 1-7, 2012.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2006.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 2008, vol.14, n.5, pp. 408-411. ISSN 1517-8692.

PRADO, F. A.; ANDINDER, A. L.; JAIME, A. P. G.; LIMA, A. P.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R. F. Defeitos ósseos em tíbia de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v.1, n.8, p. 7-13, 2006.

PRENTICE, W. E. **Fisioterapia na prática esportiva uma abordagem baseada em competências**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

VILELA, M. G.; SANTOS JÚNIOR, J. L.; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Revista Femina**, v. 35, n. 10, p. 667-670, out. 2007.

ANEXO

Anexo I - Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA).



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315 Campus
Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423; e-
mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 040/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS
PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 014/16**

Projeto Pesquisa: "Efeitos da Sinvastatina e Hidroclorotiazida em Lesões Ósseas Criadas Experimentalmente na Tibia De Ratos Wistar".

Pesquisador Responsável: Francisco Cláudio Dantas Mota.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 28 de março de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU.