

CATARINA ISABEL ARAGÃO COELHO

**Contribuição para a caracterização da ovelha como
modelo animal para a investigação da osteoporose**

Orientadores: Professor Doutor Rui Pedro Brás Martins Faísca
Professora Doutora Maria Isabel Ribeiro Dias

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2017**

CATARINA ISABEL ARAGÃO COELHO

**Contribuição para a caracterização da ovelha como
modelo animal para a investigação da osteoporose**

Dissertação defendida em provas públicas para
obtenção do Grau de Mestre no curso de
Mestrado em Medicina Veterinária conferido
pela Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias, no dia 9 de fevereiro de 2018, com
o Despacho Reitoral nº 68/2018, mediante a
seguinte composição de júri:

Professora Doutora Margarida Alves
Professor Doutor Henrique Armés
Professor Doutor Rui Pedro Faísca

Orientadores:
Professor Doutor Rui Pedro Brás Martins Faísca
Professora Doutora Maria Isabel Ribeiro Dias

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Pedro Faísca, pela pronta disponibilidade em orientar o meu trabalho, pela dedicação, pelos conselhos, pela sabedoria, o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora externa, Professora Doutora Maria Isabel Dias, pela oportunidade em integrar este grupo de investigação, pelo incansável apoio, pela inteira disponibilidade, pela paciência e pela amizade que sempre demonstrou para comigo.

Ao Professor Doutor João Requicha, pela preocupação, pelos sábios conselhos, pela consideração e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Professor Doutor Jorge Azevedo, pela sua disponibilidade e dedicação no apoio do tratamento estatístico dos dados que compõe a minha dissertação de mestrado.

À Direção e todo o corpo docente da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, pelos exemplares anos de formação profissional e pela oportunidade de aprender com profissionais de excelência.

Ao corpo clínico, docente e restantes trabalhadores do Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela integração e pelos imprescindíveis conhecimentos partilhados.

À Sandy e ao Mário, pela amizade e companheirismo ao longo destes anos, por todos os momentos que partilhámos que ficarão sempre guardados comigo.

Aos meus extraordinários pais, por sempre acreditarem e apoiarem os meus sonhos, pelos eternos conselhos, pela paciência, pela exemplar educação e por me ensinarem que desistir nunca é opção.

Aos meus avós, pelo carinho, preocupação e pela partilha da sua enriquecedora experiência de vida.

Ao meu amor, João Bordelo, pelo amor e amizade, pela eterna paciência, pelo apoio incondicional e por reforçar a certeza de que não existem impossíveis.

A todos, o meu reconhecido agradecimento.

RESUMO

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO) consequência do aumento da remodelação óssea. É uma doença metabólica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, de diferentes idades, em ambos os sexos, mas na sua maioria atinge mulheres no período da menopausa.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a contribuição da ovelha como modelo animal no estudo da osteoporose. Foram alvo de investigação onze ovelhas (cinco pertencentes ao grupo experimental e seis ovelhas ao grupo controlo) da raça Serra da Estrela com idade média de quatro anos. Os animais do grupo experimental foram submetidos a uma ovariectomia bilateral e posterior tratamento com administração de dexametasona semanalmente durante seis meses. Após esse período, todos os animais foram eutanasiados.

Foram realizadas análises dos parâmetros hematológicos e citologia de medula óssea, antes e após a indução da condição de osteoporose para avaliar a repercussão provocada pelo modelo e assim contribuir para a caracterização do modelo ovino. A análise bioquímica sérica, DMO e a microtomografia computadorizada (micro-TC) realizada a todas as vértebras lombares, dos animais do grupo controlo e experimental, serviram como base para o diagnóstico da doença.

No final do estudo, foi possível realizar a caracterização do modelo ovino e verificar a condição de osteopenia desenvolvida durante os seis meses de estudo.

Palavras-chave: Osteoporose; Ovelha; Hematologia; Bioquímica; Medula óssea; Densidade mineral óssea; Microtomografia computadorizada

ABSTRACT

Osteoporosis is a metabolic bone disease characterized by decreased bone mineral density (DMO) because of increased bone remodeling. It is a metabolic disease that affects millions of people around the world, of different ages, in both sexes, but mostly affects women in the menopause.

The present study aims to evaluate the contribution of sheep as an animal model in the study of osteoporosis. Eleven ewes (five belonging to the experimental group and six sheep to the control group) of the Serra da Estrela breed with an average age of four years were used in this study. The animals in the experimental group underwent bilateral ovariectomy and subsequent treated with a weekly administration of dexamethasone for six months. After this period, all animals were euthanized.

Hematologic parameters and bone marrow cytology were analyzed before and after the induction of the osteoporosis condition to evaluate the repercussion of this treatment and characterization the sheep as experimental animal model of osteoporosis. Serum biochemical analysis, DMO and computerized microtomography (micro-TC) were made on all lumbar vertebrae of the control and experimental animals serving for diagnosis of disease.

At the end of the study, it was possible to characterize the sheep model and to verify the condition of osteopenia developed during the six months of study.

Keywords: Osteoporosis; Sheep; Hematology; Biochemistry; Bone Marrow; Bone mineral density; Computerized Microtomography

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

ALP- Fosfatase alcalina (do inglês, *Alkaline phosphatase*)

ALT- Alanina aminotransferase (do inglês, *Alanine aminotransferase*)

AST- Aspartato amino-transferase (do inglês, *Aspartate aminotransferase*)

BS/BV- Volume ósseo/ superfície óssea (do inglês, *Bone surface/bone volume*)

BV/TV- Fração de volume ósseo (do inglês, *Bone volume fraction*)

Ca- Cálcio

CV- Coeficiente de variação

DMO- Densidade mineral óssea

DMOv- Densidade mineral óssea volumétrica

EDTA- Ácido etileno diamino tetracético (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

FDA- Food and Drug Administration (do inglês, *Fetal bovine serum*)

GDH- Glutamato desidrogenase (do inglês, *Glutamate dehydrogenase*)

GGT- γ - Gama Glutamil transferase (do inglês, *Gamma-glutamyl transferase*)

HCT- Hematócrito

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês, *Insulin-like growth factor-1*)

IGN- γ - Interferão gama (do inglês, *Interferon gamma*)

IL-1- Interleucina-1 (do inglês, *Interleukin-1*)

IL-6- Interleucina 6 (do inglês, *Interleukin-6*)

K⁺- Potássio

LDL- Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density lipoprotein*)

MEC- Matriz extracelular

HCM- Hemoglobina corpuscular média (do inglês, *Mean corpuscular hemoglobina*)

CHCM- Concentração de hemoglobina corpuscular média (do inglês, *Mean corpuscular hemoglobin concentration*)

VCM- Volume corpuscular médio (do inglês, *Mean corpuscular volume*)

Mg- Magnésio

MSCs- Células estaminais mesenquimatosas (do inglês, *Mesenchymal stem cells*)

Na⁺- Sódio

Micro-TC – Microtomografia computadorizada (do inglês, *Micro computed tomography*)

OMS- Organização Mundial de Saúde

P- Fósforo

RANK- Recetor ativador do fator nuclear kapa B (do inglês, *Receptor activator of NF-κB*)

RANKL- Ligante do recetor do ativador do fator nuclear kapa B (do inglês, *Receptor activator of NF-κB ligand*)

RBC- Eritrócitos (do inglês, *Red blood cells*)

RDW- Amplitude de distribuição dos eritrócitos (do inglês, *Red cell distribution width*)

RNA- Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*)

ROI- Região de interesse (do inglês, *Region of interest*)

SDH- Sorbitol desidrogenase (do inglês, *Sorbitol dehydrogenase*)

TC- Tomografia computadorizada

TCQ- Tomografia computadorizada quantitativa

TNF- Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor*)

Tb.N- Número trabecular (do inglês, *Trabecular number*)

Tb.Sp- Espaçamento trabecular (do inglês, *Trabecular separation*)

Tb.Th- Espessura trabecular (do inglês, *Trabecular thickness*)

TRAP- Fosfatase ácida tartarato-resistente (do inglês, *Tartrate-resistant acid phosphatase*)

VCAM-1- Molécula de adesão celular vascular 1 (do inglês, *Vascular cell adhesion protein 1*)

VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês, *Very low-density lipoprotein*)

VOI- Volume de interesse (do inglês, *Volume of interest*)

W- Teste de Shapiro-Wilk

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS	5
ÍNDICE GERAL	8
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR	12
II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	13
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OSTEOPOROSE	13
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA OSTEOPOROSE	13
1.1.2. SINTOMATOLOGIA	17
1.1.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	18
1.2. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO ESTUDO DA OSTEOPOROSE	25
1.2.1. MODELOS ANIMAIS UTILIZADOS NA INDUÇÃO DE OSTEOPOROSE	25
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. ANIMAIS	35
3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA OSTEOPOROSE	35
3.3. ANÁLISE HEMATOLÓGICA	36
3.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA SÉRICA	36
3.5. COLHEITA E ANÁLISE DE MEDULA ÓSSEA	37
3.6. EXAME IMAGIOLÓGICO – MICROTOMOGRÁFIA COMPUTORIZADA	37
3.6.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS VERTEBRAIS	37

3.6.2 ANÁLISE IMAGIOLÓGICA POR MICRO-TC	37
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	38
4. RESULTADOS	39
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA	39
4.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MODELO INDUZIDO NOS OVINOS	39
4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE HEMATOLÓGICA	39
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE CITOLÓGICA DE MEDULA ÓSSEA	41
4.3. AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO DE OSTEOPOROSE	46
4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE BIOQUÍMICA SÉRICA	46
4.3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTORIZADA	47
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	58
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	I

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação laboratorial geral em situações de diminuição de massa óssea. Fonte: Eastell, 2016 e Aguilar, 2015.	18
Tabela 2. Critério da OMS para a classificação da osteopenia e osteoporose. Fonte: Macías, 2015.	20
Tabela 3. Resultados obtidos na análise dos parâmetros hematológicos.	40
Tabela 4. Resultados obtidos na análise citológica de medula óssea.	44
Tabela 5. Resultados obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos no Grupo Controlo.	47
Tabela 6. Resultados obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos.	48
Tabela 7. Resultados obtidos na análise dos parâmetros obtidos na DMO e micro-TC.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Diagrama 1. Efeitos diretos e indiretos provocados pelos glucocorticoides conduzindo à osteoporose e aumento do risco de fraturas. Fonte: Canalis, 2007	16
Figura 1. Imagem tridimensional da micro-arquitetura trabecular do corpo vertebral de ovelha utilizando a técnica de micro-TC. A- Grupo controlo, B- Grupo 6 meses após ovariectomia, C- Grupo 12 meses após ovariectomia. Fonte: Wu <i>et al.</i> , 2008	25
Figura 2. Representação do suprimento vascular da medula óssea em ossos longos. Fonte: Travlos, 2012.	29
Figura 3. Comparação do peso de cada animal no grupo pré-indução e pós-indução da osteoporose.	38
Figura 4. Imagem tridimensional do corpo vertebral de um animal do grupo experimental utilizando a técnica de micro-TC, gentilmente cedida pelo Dr. Pedro Babo pertencente ao Grupo 3 B's.	52

I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular foi desenvolvido na área de medicina interna e cirurgia de pequenos animais no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real (Portugal), sob a orientação da Professora Doutora Maria Isabel Ribeiro Dias.

O mesmo teve início no dia 01 de setembro de 2016 e prolongou-se até ao dia 29 de dezembro do mesmo ano.

Os principais objetivos do estágio curricular prendiam-se com o aprofundamento dos conhecimentos teóricos adquiridos durante os últimos cinco anos e o aperfeiçoamento/aprendizagem da componente prática exigida na clínica de pequenos animais.

Durante o período de estágio foi possível o contacto e intervenção em diversos casos clínicos, em situação de consultas de rotina/especialidade e correspondente acompanhamento, de realização de exames complementares, de internamento de animais hospitalizados e de cirurgias de diversas especialidades.

As áreas acompanhadas durante este período foram as seguintes: Medicina Interna, Oftalmologia, Reprodução, Oncologia, Anestesiologia, Cirurgia de Tecidos Moles, Dermatologia, Nutrição, Imagiologia, Cardiologia, Ortopedia, Fisioterapia, Neurologia e Nefrologia e Urologia.

Durante o período descrito acima e durante alguns meses anteriores, foi também possível o desenvolvimento e acompanhamento do trabalho experimental que irá ser descrito, desde a indução da osteoporose dos cinco animais até à eutanásia e recolha de amostras biológicas de todos os animais envolvidos no estudo.

No final de todo o período, os objetivos estabelecidos inicialmente foram atingidos tendo sido possível o contacto com a rotina diária de trabalho de um Hospital Veterinário e, o facto de se tratar de um estabelecimento universitário, permitiu criar um ambiente de troca de conhecimento com alunos de Medicina Veterinária da instituição enriquecendo ainda mais o estágio curricular.

II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Osteoporose

1.1.1. Epidemiologia e fisiopatologia da osteoporose

A osteoporose é uma doença óssea metabólica que afeta predominantemente mulheres caucasianas, de idade avançada e no período pós-menopausa. O elevado consumo de fósforo, a Diabetes mellitus e uso crónico de benzodiazepinas estão também associados à doença em causa. As mulheres afro-descendentes, por possuírem uma maior massa óssea, são menos suscetíveis à doença (Curtis *et al.*, 2017).

No caso dos homens, como a diminuição da testosterona não ocorre de uma forma tão acentuada como acontece no caso do estrogénio e, por possuírem ossos mais densos, a doença apenas se desenvolve numa idade mais avançada comparativamente à mulher (Sattari *et al.*, 2017) denominando-se de osteoporose senil.

A doença ocorre predominantemente em idosos, com idade superior a 85 anos, afetando 50% das mulheres e 20% dos homens nessa faixa etária. Enquanto que abaixo dos 50 anos de idade, os valores equivalentes para homens e mulheres é de respetivamente, 2,4 % e 5% (Schreiber *et al.*, 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 200 milhões de mulheres são afetadas pela osteoporose em todo o mundo, sendo a doença óssea metabólica com maior prevalência na população (Peralta *et al.*, 2016).

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada pelo aumento da remodelação óssea que resulta numa densidade mineral óssea inferior à normal, deterioração da arquitetura óssea, com trabéculas finas e microfraturas (Donos *et al.*, 2015). Desta forma, há um aumento da porosidade do osso trabecular e afilamento do osso cortical. As alterações descritas resultam numa redução da resistência óssea e, conseqüente aumento do risco de fratura, principalmente no colo do fémur, pulso, pélvis e vértebras lombares (Macías *et al.*, 2015).

Os fatores predisponentes da doença incluem fatores intrínsecos, como fatores genéticos, alterações hormonais, níveis de stress oxidativo, encurtamento dos telómeros e fatores extrínsecos como o estilo de vida e nutrição (Eschler *et al.*, 2015).

A osteoporose é uma doença poligénica, onde muitos genes têm efeito, até 80%, sobre várias características do esqueleto e no risco de fratura. São exemplo, polimorfismos no recetor da vitamina D, estrogénio recetor alfa, colagénio tipo I e proteínas morfogenéticas ósseas, que foram identificados como os principais reguladores do controle da massa óssea (Begoña Pineda *et al.*, 2014).

Estudos envolvendo gémeos monozigóticos e dizigóticos demonstraram a alta heritabilidade de vários parâmetros estruturais ósseos concluindo que a acumulação de massa óssea durante o crescimento e desenvolvimento de um indivíduo é em grande parte determinada pela sua componente genética. Foi também demonstrado que o pico de massa óssea em adultos pode ser predito com precisão em crianças antes do início da puberdade (Begoña Pineda *et al.*, 2014).

Em constante metabolismo, o tecido ósseo é constituído por osteócitos, osteoblastos, osteoclastos e pela matriz extracelular (MEC) óssea. O processo de destruição e remodelação óssea são assegurados pelo equilíbrio entre a atividade dessas células. Os osteoblastos, com origem numa célula mesenquimatosa indiferenciada, desempenham uma função básica de formação de tecido ósseo (Burket *et al.*, 2013).

Os osteócitos, por sua vez, têm origem nos osteoblastos e, a sua principal função é a síntese de tecido ósseo. Localizam-se em lacunas estando envolvidos nas funções de manutenção óssea. São uma importante fonte do recetor ativador do fator nuclear kapa B/ligante do recetor do fator nuclear kapa B (RANK/RANKL) que regulam a síntese e maturação de osteoclastos e da interleucina-33 como citocina anti-osteoclastogénica e as interleucinas 34 e 17 como citocinas pró-osteoclastogénicas (Burket *et al.*, 2013).

Os osteoclastos são células do sistema mononuclear fagocitário responsáveis pela reabsorção óssea (Burket *et al.*, 2013).

Durante a vida adulta, ocorre um equilíbrio entre os mecanismos de reabsorção óssea e de formação óssea. Quando ocorre um desequilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos (remodelação óssea) há um favorecimento na reabsorção óssea, desenvolvendo-se a osteoporose (Verbruggen *et al.*, 2015).

A densidade mineral óssea é adquirida desde a fase intrauterina, com aumento significativo aquando da puberdade atingindo um pico no adulto jovem. Em mulheres, após a perda da menstruação, a velocidade de perda óssea é acentuada podendo levar à perda de até um terço do osso trabecular e 15% do osso cortical nos primeiros 5 a 10 anos de menopausa devido a uma carência de estrogénio. A este grupo de pacientes é-lhe diagnosticado osteoporose primária ou pós-menopausa podendo acometer 50% das mulheres (Donos *et al.*, 2015). Incluídos na classificação de osteoporose primária estão também presentes a osteoporose senil, idiopática e juvenil idiopática. A osteoporose senil, ocorre em pacientes com mais de 70 anos de idade em ambos os sexos, onde ocorre uma diminuição do potencial replicativo dos osteoblastos culminando numa diminuição da formação óssea, em conjunto com a perda de potência biológica das proteínas ligadas à MEC (fatores de crescimento) e da diminuição da atividade replicativa das células osteoprogenitoras (Guillot, 2015).

Na osteoporose idiopática, a patogenia é incerta pensando-se que ocorrem anormalidades na função dos osteoblastos, diminuição do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) ou deficiência estrogénica subclínica. Ocorre com maior frequência em mulheres pré-menopausa e homens com idade média de 35 anos, com múltiplas fraturas e história familiar de ocorrência de osteoporose (Xavier Guillot, 2015).

A osteoporose juvenil idiopática, condição incomum e auto-limitante, ocorre na puberdade com presença de compressão vertebral, biconcavidade, colapsos vertebrais e fraturas metafisárias (Xavier Guillot, 2015).

Por sua vez, a osteoporose pós-menopausa, é caracterizada pela presença de reabsorção óssea acelerada decorrente da escassez de estrogénio causando supressão da paratormona, reduzindo a formação de 1,25-diidroxitamina D e diminuindo a absorção de cálcio no intestino. O estrogénio desempenha um papel fundamental nesta doença dado que os seus efeitos estão ligados a um sistema de moléculas que são intituladas de ligantes do recetor do ativador do fator nuclear kapa B (RANKL), pelo seu recetor (RANK) e pelo seu recetor solúvel, a chamada osteoprotegerina. O RANKL é expresso na superfície dos precursores de osteoblastos e o RANK, por sua vez, é expresso na superfície dos precursores dos osteoclastos. Na presença de grande quantidade de macrófagos (fator estimulante) ocorre a ligação do RANK ao RANKL, ocorrendo a diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros. Este processo é impedido pela osteoprotegerina quando esta se liga ao RANKL. Neste ponto, é possível compreender a ação dos estrogénios dado que a sua ausência leva a uma diminuição da produção de

osteoprotegerina e, conseqüentemente, aumento da diferenciação de osteoclastos maduros e aumento da reabsorção óssea. A diminuição de estrogénio conduz também ao aumento da produção de citocinas com capacidade de induzir reabsorção óssea pela estimulação da formação de osteoclastos na medula óssea [IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)] e à redução da produção de fatores de crescimento que induzem a formação óssea (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e fator de crescimento- β transformante). É de salientar, que o TNF tem a função de estimular a produção do fator estimulante de colónias de macrófagos, criando um ciclo nesta doença (Alejandro & Constantinescu, 2017) (Leonardo Bandeira, 2016).

As causas de osteoporose são diferentes em casos específicos, mas está sempre presente o comprometimento do equilíbrio entre a atividade de formação óssea e reabsorção de agentes estimulantes, sendo eles, estrogénio, androgénio, calcitonina, fatores de crescimento tipo insulina (IGF-1, IGF-2), interferão gama (IGN- γ), prostanoide e paratormona (Kielbowicz *et al.*, 2016).

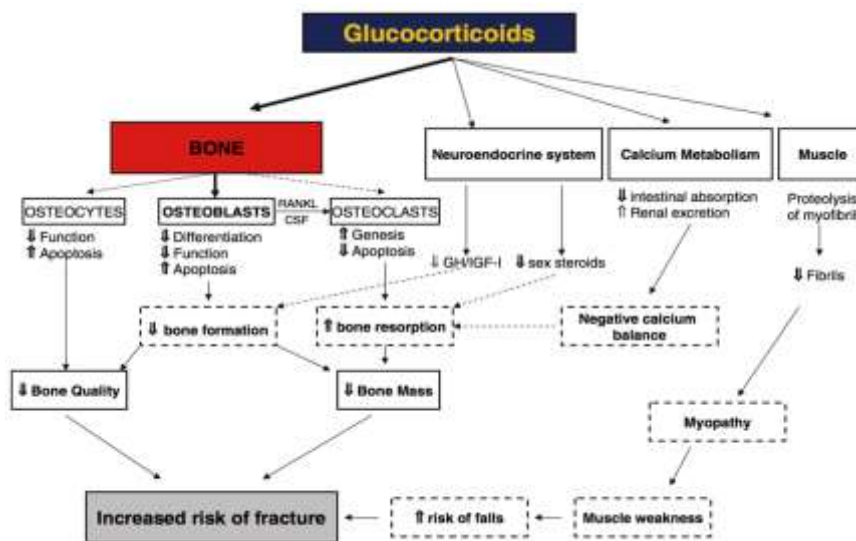


Diagrama 1. Efeitos diretos e indiretos provocados pelos glucocorticoides conduzindo à osteoporose e aumento do risco de fraturas.

Fonte: Canalis *et al.*, 2007

A osteoporose secundária pode surgir em qualquer idade como resultado de qualquer doença que afete a remodelação óssea, como é exemplo a baixa ingestão de cálcio ou toma de certos fármacos como são exemplo os corticoesteroides (Donos *et al.*, 2015). Existem ainda as causas ditas secundárias com capacidade de provocar a doença. Os principais exemplos a destacar são os seguintes:

- Distúrbios metabólicos- hipertireoidismo pela produção aumentada da hormona tiroídiana que induz a perda de massa óssea, o hiperparatireoidismo pela produção em excesso e de forma contínua da paratormona levando a uma perda de massa óssea, o hipogonadismo pela deficiência em testosterona que acelera a perda de massa óssea, o tabagismo que provoca diminuição dos níveis de estradiol e acelera a menopausa em mulheres e, por fim, o uso de glucocorticoides que provocam rapidamente reabsorção da massa óssea, desenvolvendo-se em 3 a 6 meses, aumentando o risco de fratura com doses baixas de 2,5-7,5 mg/dia. O seu uso a longo prazo (três meses ou mais) leva a uma incidência de fraturas de 30% a 50% principalmente em indivíduos com mais de 40 anos e naqueles em que são administradas elevadas doses;
- Doenças gastrointestinais- síndrome de má absorção e gastrectomia subtotal;
- Desordens da medula óssea- mieloma múltiplo, linfoma e leucemia;
- Doenças do tecido conjuntivo- artrite reumatoide;
- Drogas- álcool, heparina e quimioterapia;
- Imobilização (Guillot, 2015) (Eastell, 2016).

1.1.2. Sintomatologia

Na osteoporose, ocorrem alterações na diáfise e metáfise do osso, perda das trabéculas do osso esponjoso e adelgaçamento do osso cortical (Farias *et al.*, 2015).

Desta forma, os ossos ficam mais propensos ao desenvolvimento de fraturas, com diminuição da capacidade física, do tónus muscular e, com consequente alteração da marcha e equilíbrio (Cruz *et al.*, 2012).

O primeiro sinal poderá ser uma fratura sem qualquer explicação durante uma atividade do quotidiano que normalmente não ocorreria (Cruz *et al.*, 2012).

Os principais locais afetados são as vértebras, costelas, úmero, porção distal do rádio, colo do fémur e anca (Alejandro & Constantinescu, 2017).

Aquando de uma fratura vertebral que resulte em deformidade, os pacientes poderão apresentar dor crónica e uma combinação de cifose dorsal e lordose cervical (Curtis *et al.*, 2017) (Alejandro & Constantinescu, 2017).

As fraturas que apresentam um maior risco são as que ocorrem na anca sendo geralmente causadas por quedas (Curtis *et al.*, 2017).

1.1.3. Métodos de diagnóstico

O diagnóstico da osteoporose tem como base a anamnese onde é importante obter informação sobre o sexo, idade, etnia, história familiar, presença de outro tipo de doença, hábitos de vida como são exemplo a ingestão de bebidas alcoólicas, tabagismo e sedentarismo, medicações, hábitos alimentares, problemas hormonais, presença de dor toraco-lombar aguda ou crónica e relato de diminuição da estatura. Segue-se o exame físico onde é observada a estatura, peso corporal, presença de hipercifose dorsal ou de outras deformidades esqueléticas. Caso a história pregressa e os achados no exame físico sejam sugestivos de causas secundárias de perda óssea, a avaliação laboratorial poderá ser necessária. É realizada, por exemplo, a medição da paratormona, 25-hidroxivitamina D, teste de supressão com dexametasona, mielograma, medição de testosterona em homens, ferro e ferritina (aquando de suspeita de hemocromatose), anticorpos antigliadina e anti-endomisio (Eastell, 2016) (Macías *et al.*, 2015). Na Tabela 1 é possível analisar a avaliação laboratorial geral em situações de diminuição de massa óssea de forma a descartar causas secundárias:

Tabela 1. Avaliação laboratorial geral em situações de diminuição de massa óssea

Fonte: Eastell, 2016; Aguilar *et al.*, 2015.

EXAME/RESULTADO	DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS
Cálcio elevado	Hiperparatiroidismo primário, metástase óssea
Fósforo baixo	Hiperparatiroidismo primário, osteomalácia
25-hidroxivitamina D baixa	Deficiência em vitamina D, osteomalácia
Fosfatase alcalina elevada	Osteomalácia, doença de Paget
Calciúria de 24 horas elevada	Hipercalciúria
Calciúria de 24 horas baixa	Deficiência em vitamina D, má absorção

EXAME/RESULTADO	DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS
Eletroforese de proteínas com pico monoclonal	Mieloma múltiplo
TSH elevado	Hipertiroidismo
FSH elevado	Menopausa
Testosterona livre diminuída	Hipogonadismo masculino
Anticorpos:antigliadina, antiendomiso positivos	Doença celíaca
Paratormona elevada	Hiperparatiroidismo
Creatinina sérica elevada	Insuficiência renal
Enzimas hepáticas alteradas	Insuficiência hepática
Cortisol livre: urina de 24 horas elevado ou teste de supressão com dexametasona positivo	Síndrome de Cushing

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, úteis na monitorização da osteoporose, podem também ser medidos sendo divididos em marcadores de formação e de reabsorção óssea. Os marcadores de formação óssea incluem a fosfatase alcalina total e fração óssea, a osteocalcina e os propeptídeos carboxil ou aminotermiais do colagénio tipo I. Os marcadores de reabsorção óssea mais utilizados são os produtos de degradação do colagénio (Barco *et al.*, 2012).

Por último, é necessário recorrer a exames complementares por imagem. A radiografia apenas é indicada no diagnóstico de fraturas, não podendo ser utilizada para o diagnóstico de osteoporose dado que a presença de osteopenia apenas é detetado quando a perda de massa óssea é superior a 30% (Kalpakcioglu *et al.*, 2011).

Assim, o diagnóstico de osteoporose tem por base a quantificação de massa óssea, sendo a densitometria óssea o método de eleição com melhor relação custo/benefício e não-invasivo (Adi Cohen, 2016).

A OMS propôs uma estratificação da osteoporose baseada no T-score que representa o número de desvios padrão pelo qual a densidade mineral óssea do paciente difere do pico de densidade óssea de indivíduos do mesmo sexo e etnia, sendo já bem estabelecida uma classificação para mulheres na pós-menopausa demonstrada de seguida na Tabela 2 (Macías *et al.*, 2015) (Guillot, 2015).

Tabela 2. Critério da OMS para a classificação da osteopenia e osteoporose
Fonte: Macías *et al.*, 2015.

Critério da OMS para a classificação da osteopenia e osteoporose	
Categoria	T-score
Normal	-1.0 ou acima
Baixa massa óssea (osteopenia)	entre -1.0 e -2,5
Osteoporose	-2.5 ou abaixo

Desta forma, a osteoporose é diagnosticada quando a DMO é $\geq 2,5$ desvio-padrão abaixo da média da DMO de uma população de jovens adultos saudáveis medida por absorciometria de raio-x com dupla energia. O diagnóstico de osteopenia é realizado quando a DMO se encontra entre 1,0 e 2,5 desvio-padrão abaixo da média (Guillot, 2015) (Acharya *et al.*, 2017).

É também relatado o Z-score que representa o número de desvios padrão pelo qual a densidade óssea do paciente difere de indivíduos com a mesma idade, sexo e etnia, onde valores ≤ -2.0 desvio-padrão poderão ser sugestivos de causas secundárias de osteoporose. Este tipo é utilizado em crianças e em mulheres pré-menopausa (20 anos até menopausa) onde a DMO por si só não deverá ser utilizado para diagnosticar osteoporose (Macías *et al.*, 2015) (Guillot, 2015) (Acharya *et al.*, 2017).

A medição da DMO deverá ser realizada na coluna e na anca. A medição no antebraço apenas deverá ser avaliada caso a anca e/ou a coluna não possam ser medidas

ou interpretadas na presença de hiperparatiroidismo e em pacientes muito obesas (Guillot, 2015).

Existem diversos artefactos que poderão estar presentes, como são exemplo a gordura em excesso que poderá elevar a DMO ou a escoliose acentuada que poderá reduzir falsamente a DMO, sendo assim essencial uma interpretação atenta e correta (Macías *et al.*, 2015).

A grande limitação da DMO é a não avaliação da qualidade óssea (Sujic *et al.*, 2016).

Dentro das possibilidades do exame complementar por imagem, é também incluída a tomografia computadorizada quantitativa (TCQ) que tem como objetivo a medição da DMO volumétrica (DMOv) em mg/cm^3 , utilizando um software especial num equipamento padrão de tomografia. Tem capacidade para distinguir o compartimento ósseo cortical e trabecular podendo realizar a medição da DMO na coluna e em alguns equipamentos na anca. A TCQ é utilizada principalmente em pesquisas clínicas com o intuito de avaliar a estrutura e o tamanho ósseo, eventuais mudanças nos compartimentos corticais e trabeculares que possam ocorrer em terapias medicamentosas e/ou doenças do metabolismo ósseo (Kalpakcioglu *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, a desvantagem da DMO no diagnóstico da osteoporose é a não avaliação da qualidade óssea, sendo esta responsável por 20% a 40% da resistência óssea. Diversos fatores são responsáveis pela criação da qualidade óssea, nomeadamente, a remodelação óssea, a geometria, microarquitetura, mineralização, a componente da matriz óssea e mineral e as microagressões (Acharya *et al.*, 2017).

A análise da qualidade óssea é possível por métodos invasivos e não invasivos. Como métodos não invasivos são incluídas a tomografia periférica computadorizada e a tomografia periférica computadorizada de alta resolução onde é possível avaliar a microarquitetura do osso trabecular e cortical do rádio e ulna e obter imagens tridimensionais com alta resolução. Os métodos invasivos incluem a biópsia óssea para realização de microtomografia computadorizada e histomorfometria. Poderá ser realizada biópsia da crista ilíaca em osso calcificado marcada com tetraciclina. A biópsia tem como objetivo monitorizar/estabelecer a qualidade óssea particularmente o grau de mineralização e a microarquitetura, avaliar a remodelação óssea e analisar o efeito do tratamento na estrutura óssea. Este método apenas é utilizado em casos especiais em que a osteoporose

não apresenta causas aparentes ou quando não há resposta terapêutica (Kalpakcioglu *et al.*, 2011) (Aguilar *et al.*, 2015).

Os principais grupos de pacientes que são alvo de estudo da massa óssea são as mulheres com 65 anos de idade ou mais, mulheres na pós-menopausa com idade inferior a 65 anos de idade, mas com fatores de risco para a osteoporose, homens com 70 anos de idade ou mais, adultos com fraturas de fragilidade, adultos com doença ou condição associada a baixa massa óssea ou perda óssea, adultos que tomam medicação associada com baixa massa óssea ou perda óssea e pacientes em tratamento para a osteoporose, de forma a monitorizar o seu tratamento (Nguyen, 2016).

1.1.3.1. Fosfatase Ácida Tartrato Resistente (TRAP) - Marcador bioquímico de reabsorção óssea

Nos últimos anos, com o reconhecimento da importância do estudo mais aprofundado da osteoporose, têm sido desenvolvidos novos estudos relacionados com marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (Sousa *et al.*, 2011).

Os marcadores bioquímicos derivados de tecido ósseo auxiliam no diagnóstico e prognósticos de doenças ósseas metabólicas, como é exemplo a osteoporose, pois permitem uma avaliação dinâmica da cicatrização óssea (Sousa *et al.*, 2011). Estes são divididos em marcadores de formação óssea e em marcadores de reabsorção óssea (Sousa *et al.*, 2014).

Aquando da investigação de doenças ósseas é de extrema importância que o marcador selecionado seja o mais sensível e específico possível e a TRAP revelou ser uma das enzimas mais relevantes na avaliação da reabsorção do tecido ósseo (Sousa *et al.*, 2011).

A TRAP é expressa maioritariamente nos ossos e baço e em menor concentração nos pulmões, fígado, cólon e rim. O soro contém duas isoformas, codificadas pelo mesmo gene: a isoforma 5b, considerada o marcador bioquímico mais sensível e específico de reabsorção óssea dado que é produzida apenas por osteoclastos, enquanto que a sua outra isoforma, 5a, se trata de uma forma não osteoclástica derivada de macrófagos e células dendríticas (Sousa *et al.*, 2011).

Os osteoclastos são formados por pregas na sua membrana plasmática aderentes à matriz óssea, onde é criado um microambiente fechado, para onde são segregados ácidos, colagenases e TRAP provocando a degradação da componente orgânica da matriz e dissolução dos cristais de hidroxiapatite (Alatalo *et al.*, 2003).

A atividade da TRAP é regulada pela redução de iões de ferro no centro da enzima, estando ativa quando reduzida e inativa quando oxidada. A regulação descrita provoca alterações na sua coloração, apresentando uma cor púrpura na sua forma inativa (oxidada), cor rosa na sua forma ativa (reduzida) e sem cor quando se encontra fortemente reduzida (Alatalo *et al.*, 2003).

1.1.3.2. Microtomografia computadorizada

A microtomografia computadorizada (micro-TC) de raios X é uma variante da tomografia computadorizada (TC) de raios X convencional e surgiu acompanhada à necessidade de se examinarem amostras com estruturas muito pequenas, da ordem de micrómetros (μm). A micro-TC é atualmente considerada como uma das mais avançadas tecnologias de análise não destrutiva, proporcionando a construção de imagens da estrutura interna em 2D e 3D (Faot *et al.*, 2015) (Kielbowicz *et al.*, 2015).

A micro-TC é uma técnica imagiológica que permite a visualização de secções transversais (cortes internos) de um objeto de forma não invasiva. Esta técnica foi introduzida pela primeira vez por Feldkamp *et al.* (1989). O princípio de funcionamento do microtomógrafo de raios-x baseia-se na propriedade dos materiais absorverem esta radiação de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade. As amostras normalmente variam de poucos milímetros a alguns centímetros de tamanho, com resoluções espaciais de $1\mu\text{m}$ (Faot *et al.*, 2015) (Kielbowicz *et al.*, 2015).

A quantidade de energia de raios-x absorvida numa fatia de espessura conhecida é proporcional à densidade do tecido corporal (Faot *et al.*, 2015).

A imagem em micro-TC é essencialmente um mapa de ponderação de energias que resulta da atenuação do feixe de raios X nos tecidos, disponibilizada sob a forma de uma matriz de correspondência entre essas ponderações de energia atenuada numa escala de cinzentos (Campbell *et al.*, 2008).

A técnica de aquisição de imagem por micro-TC calcula a distribuição espacial do coeficiente de atenuação dos tecidos e atribui a cada pixel da imagem adquirida um valor correspondente (informação quantitativa da micro-TC), designado valor de micro-TC e especificado em unidades de Hounsfield (UH) (Genant *et al.*, 2008) (Kielbowicz *et al.*, 2015).

Esta técnica imagiológica divide virtualmente o objeto de estudo em secções nas quais são mapeados parâmetros físicos como a densidade e a porosidade de cada região interna do objeto que são apresentadas na forma de imagens bidimensionais que podem ser compostas de modo a obter objetos virtuais tridimensionais, por meio de algoritmos computacionais (Campbell *et al.*, 2008) (Perilli *et al.*, 2009). No caso dos ossos, podem-se estudar as estruturas trabeculares, proceder à verificação da existência de processos de osteopenia ou osteoporose e medir a densidade óssea (Campbell *et al.*, 2008).

A obtenção das imagens tomográficas (secções transversais) é realizada em duas etapas distintas, a primeira etapa consiste na aquisição das imagens radiográficas de diversas projeções angulares da amostra ao longo de uma rotação de 180° ou 360° com passos de rotação muito precisos (alguns décimos de graus) (Campbell *et al.*, 2008) (Perilli *et al.*, 2009) (Faot *et al.*, 2015). Após a aquisição, o computador gera uma imagem com escala de cinzas, indicando o preto a densidade do ar e o branco a densidade do osso mais duro. Isto torna esta variante da TC uma modalidade importante quando nos referimos a investigações do esqueleto. A diferença entre cinzas, ou seja, a diferença de densidades entre estruturas moles não é óptima e por essa razão pode haver alguma dificuldade em distinguir órgãos adjacentes à área de interesse. Por sua vez a segunda etapa, consiste na reconstrução das imagens das secções transversais a partir das imagens das projeções angulares por meio do algoritmo de reconstrução de feixe cónico de Feldkamp modificado que roda no *cluster* de computadores. Este processo de reconstrução cria uma completa representação 3D da microestrutura interna do objeto (Perilli *et al.*, 2009).

A micro-TC foi testada como método de avaliação de medida e análise em 3D do osso esponjoso por Muller *et al.* (1998) em que compararam os resultados morfométricos da histomorfometria convencional aos resultados deste exame imagiológico, a partir do qual os autores demonstraram que a força da representação 3D da arquitetura do osso trabecular em comparação com a histologia convencional 2D, evidenciou excelente correlação dos índices medidos.

A vantagem da micro-TC é possibilitar o estudo das mudanças na arquitetura óssea que podem analisadas em 3D, fornecendo assim informações mais valiosas do que os

métodos tradicionais, que usam apenas análises bidimensionais das seções do tecido ósseo (Campbell *et al.*, 2008).

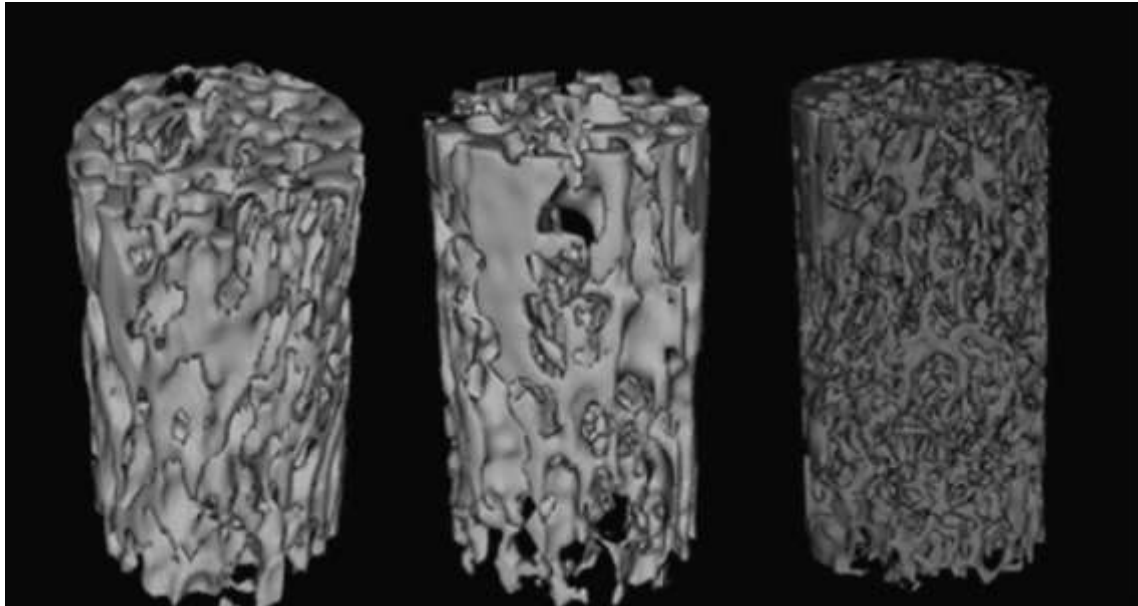


Figura 1. Imagem tridimensional da micro-arquitetura trabecular do corpo vertebral de ovelha utilizando a técnica de micro-TC. A- Grupo controlo, B- Grupo 6 meses após ovariectomia, C- Grupo 12 meses após ovariectomia. Fonte: Wu *et al.*, 2008.

Derivado às várias vantagens associadas à utilização deste exame imagiológico, na última década, esta tem sido elegida como uma das principais técnicas a utilizar em estudos experimentais com o objetivo de avaliar alterações ósseas (Turner *et al.*, 2002) (Sigrist *et al.*, 2007) (Oheim *et al.*, 2012).

1.2. Experimentação animal no estudo da osteoporose

1.2.1. Modelos animais utilizados na indução de osteoporose

O metabolismo ósseo em humanos é um fenómeno genético e biologicamente complexo que poderá tornar difícil a replicação total num modelo animal. É imperativo considerar diferenças intrínsecas no metabolismo e composição esquelética entre espécies,

bem como questões práticas, como por exemplo, tamanho, disponibilidade, custo e restrições de tempo (Lawrence *et al.*, 2013).

Os animais tais como, roedores, coelhos, ovelhas, cabras, cães, suínos e primatas, poderão ser utilizados para estabelecer modelos de estudo de osteoporose, embora os últimos quatro mencionados não são considerados preferenciais neste tipo de investigação devido ao alto custo e alimentação. Em contraste, ratos, coelhos e ovelhas são mais comumente utilizados, particularmente para o modelo de osteoporose pós-menopausa induzido por glucocorticoides (Zhang *et al.*, 2016).

1.2.1.1 Rato

É de salientar, que em humanos adultos, a atividade predominante do osso inclui modelação e remodelação. No caso do esqueleto de ratos, a remodelação segue a modelação após algum tempo de “transição” em diferentes locais, incluindo o osso esponjoso e endocortical das vertebrae lombares e da metáfise tibial proximal. Este fato é indicativo que podem ocorrer discrepâncias entre diferentes idades e diferentes locais ósseos em resposta à ovariectomia (Zhang *et al.*, 2016).

Os ratos ovariectomizados apresentam semelhanças patológicas com as mulheres na pós-menopausa, nomeadamente na reabsorção óssea que excede a formação óssea, superior reabsorção óssea no endóstio e formação óssea no perióstio resultando num aumento da cavidade medular e baixa absorção de cálcio no intestino (Govindarajan *et al.*, 2014).

As desvantagens da utilização deste animal devem-se ao curto período de remodelação e incapacidade de atingir a verdadeira maturidade esquelética (Zhang *et al.*, 2016).

1.2.1.2 Coelho

O coelho adulto possui um sistema de Havers crucial na manutenção do osso cortical permitindo a observação da mudança de massa óssea no osso cortical. Devido à predominante remodelação sobre o processo de modelação, o modelo de osteoporose do coelho é bastante útil na investigação de agentes anabólicos (Baofeng *et al.*, 2010).

Coelhos com idade compreendida entre os seis e oito meses (sexualmente maduros) são frequentemente utilizados no estudo de indução de osteoporose com recurso a glucocorticoides devido ao facto da calcificação e o encerramento das placas de crescimento da epífise ocorrerem pouco tempo depois da maturidade sexual (Baofeng *et al.*, 2010).

Em comparação com os ratos, os coelhos podem fornecer maior quantidade de amostras de soro e o tamanho ósseo é mais adequado no estudo do tratamento de fratura osteoporótica (Zhang *et al.*, 2016).

A desvantagem na utilização do coelho, como modelo animal, assenta na menor quantidade de osso esponjoso sendo um inconveniente no que toca à densitometria óssea (Baofeng *et al.*, 2010).

1.2.1.3. Ovelha

O modelo ovino apresenta vantagens significativas comparativamente a outros modelos animais utilizados no estudo da osteoporose pós-menopausa. Desta forma, as ovelhas têm sido cada vez mais utilizadas como modelo animal para estudar a eficácia de vários agentes, como por exemplo, implantes ósseos bioquímicos, na prevenção da osteoporose induzida pela idade ou ovariectomia (Kielbowicz *et al.*, 2015).

A sua taxa metabólica, com base no consumo de oxigénio por grama de peso corporal, é de 0,22, sendo mais próximo do Homem (0,21) comparativamente ao rato (0,87) ou ao cão (0,33) (Zhang *et al.*, 2016).

A ovelha é um animal extremamente dócil, com longa esperança de vida e com capacidade de fornecer uma grande quantidade de amostras como de sangue e tecido ósseo. Dado o adequado tamanho e metabolismo ósseo, a ovelha é um ótimo modelo animal para o estudo de biomateriais ou dispositivos médicos (Kielbowicz *et al.*, 2015).

Ao contrário da mulher, a ovelha apresenta um anestro anual com duração de 1 a 2 meses, embora durante o restante ano a produção de estrogénio seja relativamente elevada podendo atingir 20 ciclos de estro (Oheim *et al.*, 2016).

Numa das primeiras fases do estudo em modelos animais, o objetivo é proporcionar condições clinicamente semelhantes à osteoporose. Desta forma, irá ocorrer uma perda de massa óssea em cerca de 30% (Oheim, 2016).

A principal desvantagem da ovelha é a flutuante DMO que varia em diferentes estações do ano tendo menor valor no inverno. A limitação no longo período de indução de até seis meses e custo elevado, tornou-se menos utilizada como modelo animal na indução de osteoporose recorrendo a glucocorticoides (Kielbowicz *et al.*, 2015) (Zhang *et al.*, 2016).

1.2.1.3.1. Medula óssea

1.2.1.3.1.1. Anatomia

A medula óssea é caracterizada por um tecido liquido-gelatinoso localizada na cavidade central dos ossos axiais e longos constituída por ilhas de tecido hematopoiético e células adiposas rodeadas por seios vasculares intercaladas no interior de uma malha de osso trabecular. Nos ossos longos, um ou mais canais nutritivos atravessam o osso cortical entrando obliquamente na cavidade medular (Fattore *et al.*, 2010). No caso dos ossos planos, a medula contém numerosos vasos sanguíneos de diferentes tamanhos que entram na medula através de grandes e pequenos canais nutritivos. Após a entrada, a artéria divide-se em ramos ascendentes e descendentes e, estes por sua vez, dão origem a pequenas múltiplas arteríolas e capilares que se estendem em direção aos canais de Havers, retornando à cavidade medular e abrindo para os seios venosos. Desta forma, existe um padrão circular de fluxo sanguíneo no interior da cavidade medular (Gaivoronskiy *et al.*, 2014) (Rizzo, 2016).

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético e um tecido linfoide primário, produzindo eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas (Brain *et al.*, 2010).

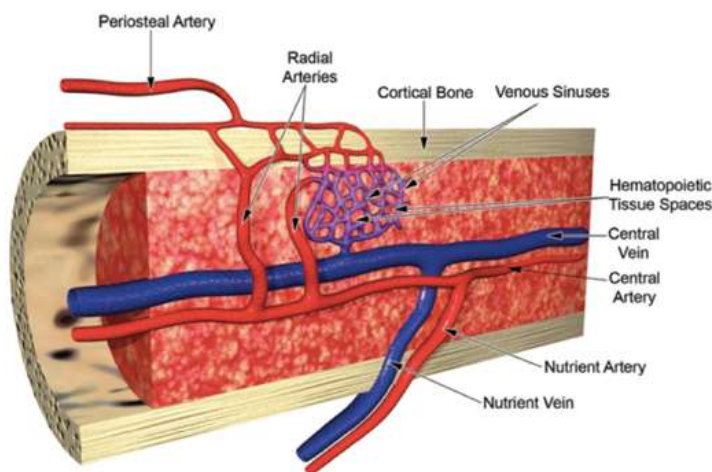
Os ossos em desenvolvimento contêm medula com capacidade de produção de eritrócitos, leucócitos e megacariócitos, a denominada medula óssea vermelha. É composta por 40% de água, 40% de gordura e 20% de proteína e localiza-se nos ossos esponjosos ou diáfises de jovens (Drake & Mitchell, 2015). Com o envelhecimento, a maioria da medula vai perdendo a sua função, sendo substituída por um tecido conjuntivo formado por células adiposas, passando assim a ser denominada de medula óssea amarela representando a medula óssea hematopoiética inativa. É composta por 15% de água, 80% de gordura e 5% de proteína e poucos capilares. Esta, por sua vez, localiza-se na diáfise dos ossos longos. A

sua principal função é o armazenamento de adipócitos cujos triglicéridos podem ser fonte de energia (Rizzo, 2016).

A conversão descrita ocorre devido a uma diminuição do número de trabéculas no osso ocorrendo de forma gradual desde o nascimento até à idade adulta. No interior dos ossos longos, a conversão de medula óssea vermelha para medula óssea amarela ocorre primeiramente na diáfise, metáfise distal e, por último na metáfise proximal. A epífise e apófise são cartilaginosas ao nascimento contendo medula óssea amarela em adulto (Drake & Mitchell, 2015) (Rizzo, 2016). Apenas alguns ossos continuam a ser constituídos por medula óssea vermelha (costelas, corpo das vértebras, componente esponjosa de alguns ossos curtos, extremidades dos ossos longos dos membros torácicos e pélvicos, ossos do crânio e esterno). Os restantes ossos do esqueleto adulto são incapazes de produzir sangue por serem constituídos apenas por medula óssea amarela, à exceção de quando ocorre uma demanda sistémica hematopoiética que excede a capacidade da medula óssea vermelha existente, onde a medula óssea amarela pode transformar-se em medula óssea vermelha podendo voltar a produzir células sanguíneas (Alves, 2010) (Lin & Kanekar, 2016).

No caso da medula óssea espinal, a medula óssea vermelha perdura ao longo da vida, mas as proporções de medula vermelha e amarela no esqueleto axial variam em função da idade e de fatores ambientais não sendo tão previsível o padrão de conversão (Rizzo, 2016).

É de salientar que poderá ocorrer uma diminuição da gordura na medula óssea, causada pela disponibilidade sazonal de alimentos que diminui no inverno, onde a gordura da medula é consumida. Caso o pobre estado nutricional perdure, a medula óssea pode torna-se gelatinosa em aparência (Weiss & Wardrop, 2010).



1.2.1.3.1.2. Células da linha hematopoiética

As células de medula óssea de ovino assemelham-se às células do humano, embora ocorram diferenças no tamanho e a relação entre o citoplasma e o núcleo que devem ser tidas em conta principalmente em processos patológicos.

A mielopoiese, eritropoiese e megacariocitopoiese ocorrem principalmente na medula óssea (Q. Acton, 2013).

A mielopoiese (granulopoiese) é composta por diferenciadas etapas de maturação que conduzem à formação de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). A maioria das células granulocíticas imaturas (mieloblastos e promielócitos) estão dispostos ao longo da superfície endosteal (zona paratrabecular) (Q. Acton, 2013). As células precursoras distribuem-se pela restante medula óssea. As células granulocíticas em maturação encontram-se nas zonas intermediárias e centrais intertrabeculares (Donald Rizzo, 2016).

Os mieloblastos são as primeiras células da granulopoiese e representam cerca de 2% dos glóbulos brancos. Estes por sua vez, diferenciam-se em promielócitos, de seguida ocorre a diferenciação em mielócitos que poderão ser classificados como neutrofilicos, basofílicos ou eosinofílicos de acordo com os seus grânulos intracitoplasmáticos que aparecem nesta fase. Por sua vez, os mielócitos diferenciam-se em metamielócitos que culminam na formação de neutrófilos maduros. (Weiss & Wardrop, 2010).

Relativamente aos linfócitos, apesar de morfologicamente serem facilmente identificáveis, encontram-se em pequeno número e distribuídos entre as restantes células.

Figura 2- Representação do suprimento vascular da medula óssea em ossos longos.
Fonte: Gregory Travlos, 2012.

Nas ovelhas, não ocorre uma diferenciação entre linfócitos grandes e pequenos, como acontece no humano (Weiss & Wardrop, 2010).

No caso dos monócitos, em esfregaços sanguíneos, estes são mais difíceis de reconhecer em ovinos do que no Homem e podem ser confundidos com mielócitos, metamielócitos ou até mesmo com linfócitos. As dificuldades no reconhecimento são causadas principalmente pela similaridade de seu citoplasma com o de neutrófilos jovens (Weiss & Wardrop, 2010).

Os megacariócitos, são considerados as células gigantes da medula óssea. (Weiss & Wardrop, 2010).

1.2.1.3.1.3. Células da linha do estroma / Células estaminais mesenquimatosas

A medula óssea possui dois compartimentos separados e independentes: o sistema hematopoiético e a medula óssea estromal. Pesquisas demonstraram que as células hematopoiéticas influenciam a atividade do compartimento do estroma e, este por sua vez, serve de suporte mecânico para a proliferação, diferenciação e maturação das células hematopoiéticas, expressando também fatores de sinalização celular que intervêm no desenvolvimento de células sanguíneas maduras (Fattore *et al.*, 2010).

O estroma inclui todos os tipos de células que se localizam entre a superfície externa dos vasos sanguíneos da medula óssea e as superfícies ósseas que encerram o espaço e tecido hematopoiético e, não pertencem à linhagem hematopoiética, e incluem adipócitos da medula, células Westen-Bainton, células de revestimento ósseo (osteoblastos inativos) e células osteoblásticas (Tollemar *et al.*, 2015).

As células mesenquimatosas estromais (MSCs) localizam-se na componente não-hematopoiética rica em tecido conjuntivo da medula óssea. São células multipotentes com capacidade de replicar células indiferenciadas e com potencial de diferenciação dando origem a linhagens de tecido mesenquimal, como são exemplo, osso, cartilagem, gordura, tendão, músculo e estroma da medula. (Desantis *et al.*, 2015).

1.2.1.3.2. Parâmetros hematológicos

A mensuração dos principais valores hematológicos fornece informações objetivas sobre a condição do animal no momento da amostragem. Desta forma, constitui um painel importante no diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças (Dias *et al.*, 2010).

Relativamente à análise hematológica é importante ressaltar que os eritrócitos (RBC) de ovinos, comparando com os restantes mamíferos, são de pequenas dimensões e de forma discoide não se deformando tão rapidamente como ocorre em outras espécies animais. A eritropoiese acelerada é acompanhada de reticulocitose, macrocitose, policromasia e pontilhados basofílicos (Etim *et al.*, 2014).

As contagens de células diferenciais de leucócitos sofrem alterações de acordo com a idade do ovino, por exemplo, os neutrófilos são dominantes durante as primeiras duas semanas de vida e às três semanas os linfócitos existem em maioria com um ratio de neutrófilos: linfócitos de 0,5 nos cordeiros (Onasanya *et al.*, 2015).

Os neutrófilos de ovinos quando corados com Wright ou Giemsa, apresentam um citoplasma com uma textura granular eosinofílica contendo grânulos primários, secundários e terciários, existindo os últimos em maior número e de forma mais densa quando comparados com outras espécies (Weiss & Wardrop, 2010).

Os núcleos da maioria dos eosinófilos de ruminantes são bilobados e rodeados por numerosos grânulos citoplasmáticos, pequenos, redondos e refratários e com citoplasma basofílico (Weiss & Wardrop, 2010).

Os basófilos de ovinos são raramente observados no sangue periférico. Estes são compostos por numerosos grânulos de pequenas dimensões e intensamente basofílicos podendo mascarar o núcleo. Como existem em pequenas quantidades, na maioria das vezes são quantificáveis de forma pouco fidedigna. A basofilia marcada é rara e associada a uma eosinofilia (Weiss & Wardrop, 2010).

Os linfócitos são de tamanho pequeno a médio e não são facilmente confundíveis com monócitos. São formados por um escasso citoplasma azul e por grânulos de tamanho variável. Com o avanço na idade, os linfócitos vão sofrendo um lento declínio (Weiss & Wardrop, 2010).

Por sua vez, os monócitos apresentam uma forma redonda, com um núcleo de grandes dimensões com padrão de cromatina difusa. O citoplasma apresenta uma coloração cinzenta contendo grânulos pequenos, indistintos e eosinófilo quando corados com Wright. Vacúolos citoplasmáticos são comuns e mais irregulares em tamanho do que aqueles observados em linfócitos de maiores dimensões (Weiss & Wardrop, 2010).

Relativamente às plaquetas, estas apresentam uma distribuição isolada com grânulos de tamanho e forma variável. O seu tempo de sobrevivência no sangue é de aproximadamente 10 dias (Weiss & Wardrop, 2010).

Os parâmetros hematológicos normais encontrados na espécie ovina são descritos na Tabela 1 em Anexo.

A determinação do hemograma é de extrema importância, pois este permite o rastreamento de possíveis anomalias do hematócrito (HCT), da morfologia eritrocitária ou de alterações na contagem total ou diferencial de leucócitos (Onasanya *et al.*, 2015).

1.2.1.3.3. Parâmetros bioquímicos séricos

Relativamente aos padrões de bioquímica sérica, é de extrema importância a perceção dos diferentes objetivos de mensuração de cada parâmetro. Assim, a creatinina é um parâmetro fundamental na avaliação da função renal pois encontra-se associada ao catabolismo da creatina e está envolvida no armazenamento e estabilização de ligações de elevada energia de grupos de fosfato relacionados com o metabolismo energético ao nível muscular, não sendo o seu nível sérico afetado pela dieta, alterações do funcionamento hepático ou pelo ciclo da ureia de forma significativa (Al-Fartosi *et al.*, 2010) (Dias *et al.*, 2010).

É de salientar, que nos ruminantes apesar da urémia se apresentar diminuída em situações de défice proteico, esta é fortemente afetada pela composição da dieta e pelo momento de obtenção da amostra sanguínea relativamente à última refeição (Dias *et al.*, 2010).

A avaliação da função hepática é realizada através da análise de aspartato amino-transferase (AST) e de enzimas hepáticas específicas, tais como, a sorbitol desidrogenase (SDH) e a glutamato desidrogenase (GDH). Como, a SDH e GDH nem sempre são acessíveis para realização rotineira, poderá optar-se pela medição da gama-glutamyltransferase (γ -GT) e da fosfatase alcalina (ALP) (Dias *et al.*, 2010).

Para a avaliação do estado mineral é necessário a mensuração dos principais minerais séricos, como cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg). É de salientar que o diagnóstico de deficiências nutricionais encontra-se fortemente dependente do nível de controlo homeostático de cada mineral e da duração do problema que se encontra na base (Dias *et al.*, 2010) (Etim *et al.*, 2014).

Aquando da avaliação do estado hidro-electrolítico é necessário a determinação dos electrólitos plasmáticos, o sódio (Na^+) e potássio (K^+), essenciais à atividade elétrica das membranas celulares. A concentração plasmática de ambos, linfática e a nível dos fluidos intersticiais, é mantida na sua maioria pela excessiva ingestão na dieta que é eliminada a

nível renal e intestinal. Os distúrbios hidro-electrolíticos encontram-se normalmente associados a restrições de água ou perdas anormais de fluidos (Dias *et al.*, 2010).

Os parâmetros bioquímicos clínicos normais encontrados na espécie ovina são descritos na Tabela 2 em Anexo.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo, realizado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e inserido numa investigação pertencente a doutorandos da mesma instituição, prende-se com a caracterização da ovelha como modelo animal no estudo da osteoporose.

A realização de exames complementares de diagnóstico, avaliação dos parâmetros bioquímicos, DMO e micro-TC das vértebras lombares, têm o propósito de comprovar a existência de condição de osteoporose. As análises hematológicas e a análise citológica da medula óssea tem como objetivo avaliar a repercussão da indução da osteoporose com recurso à ovariectomia e à terapia com dexametasona.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais, pertencentes à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, foram criados em Vila Real.

A manutenção dos animais e todas as experiências foram revistas e aprovadas pelo Comité Nacional de Uso e Cuidados com Animais e realizados de acordo com os regulamentos da Legislação da Comunidade Europeia sobre Cuidados com os Animais (Autorização DGV Of. 0420/000/000/2009, documento em anexo).

3.1. Animais

O presente estudo experimental foi conduzido com uma amostra de onze ovelhas da raça Serra da Estrela, adultas saudáveis, não gestantes e não lactantes (à exceção de uma ovelha do grupo controlo), com média de idades de 4 anos e com peso médio de 58,4 Kg.

Os animais foram divididos em dois grupos, o grupo controlo composto por seis animais e o grupo experimental composto por cinco animais. As ovelhas permaneceram alojadas num ovil divididas em dois grupos para que as ovelhas do grupo controlo não pudessem competir em dominância com as ovelhas do grupo experimental. Os animais foram mantidos com ventilação e a um constante ciclo de fotoperíodo antes e após a recolha das amostras de sangue e de medula óssea. A dieta dos animais incluiu feno suplementada com uma dose diária de 250 gramas de concentrado por animal fornecidos por volta das 08:00 horas da manhã e com água *ad libitum*. Foram examinadas diariamente e o seu bem-estar vigiado durante todo o período do estudo.

3.2. Protocolo experimental de indução da osteoporose

Inicialmente, os cinco animais do grupo experimental foram sujeitos a uma ovariectomia bilateral, cuja pré-medicação foi realizada com a administração de acepromazina (5 mg, Calmivet; Univete, Portugal) e de butorfanol na dose de 0,06 mg/kg (Torbugesic; Fort Dodge Veterinaria, Espanha), ambas por via endovenosa. A indução de anestesia foi realizada com recurso propofol (20 mg/ml, Propofol-Lipuro, Germany). Após intubação endotraqueal, a manutenção da anestesia foi à base da inalação de uma mistura de 1,5% de isoflurano (IsoFlo; Esteve Farma, Portugal) misturada em oxigénio.

A segunda componente do protocolo experimental, consistiu nas ovelhas ovariectomizadas receberem injeções intramusculares semanais de 1mg/kg/semana de fosfato sódico de dexametasona (Oradexon, Aspen) durante 6 meses.

Após seis meses, os animais foram eutanasiados através de uma injeção intravenosa de pentobarbital de sódio (1-2 mL/10Kg, Exagon, Áustria).

(Zarrinkalam *et al.*, 2009)

O protocolo descrito foi baseado em estudos experimentais anteriormente realizados com o objetivo de induzir osteoporose em modelos ovinos.

3.3. Análise hematológica

A colheita das amostras de sangue foi realizada a partir de venipunctura da veia jugular na primavera das 14:00 até às 15:00 horas e repetidas seis meses mais tarde. As amostras foram coletadas para tubos de hemograma com EDTA (Sarstedt - Monovette – Nümbrecht, Germany) para o estudo de hematologia. Após a colheita as amostras foram refrigeradas e enviadas para o laboratório veterinário INNO sediado em Braga.

O hemograma foi realizado no equipamento SYSMEX XT2000iV que utiliza as metodologias de citometria de fluxo e impedância.

3.4. Análise bioquímica sérica

Para o estudo dos parâmetros bioquímicos e eletrolíticos gerais foi coletado sangue venoso da veia jugular para tubos séricos sem anticoagulante (Sarstedt - Monovette - Serum Gel S). Após a colheita das amostras, as mesmas foram refrigeradas e enviadas para o laboratório de análises clínicas Dr. Ferraz Alves sediado em Vila Real.

Os parâmetros bioquímicos gerais foram doseados com kits de imunoensaio comercialmente disponíveis cujas referências são as seguintes: fosfatase alcalina (OSR6104), ureia (OSR6134), creatinina (OSR6178), colesterol (OSR6116), cálcio (OSR60117), GGT (OSR6020), fósforo (OSR6122), glicose (OSR6221), AST (OSR6109), ALT (OSR6107), magnésio (OSR6189) e proteínas totais (OSR6132) utilizando um método colorimétrico por espectrofotometria de absorvância molecular no equipamento OLYMPUS AU 400 (Beckman Coulter, Estados Unidos da América). A eletroforese das proteínas foi efetuada no equipamento INTERLAB G26 (Roma, Itália). O doseamento da TRAP foi também realizado no equipamento OLYMPUS AU 400 sem especificação para uma das suas isoformas.

3.5. Colheita e análise de medula óssea

As amostras de medula óssea foram obtidas a partir da crista ilíaca de todas as ovelhas presentes no estudo. O procedimento foi realizado sob anestesia local com spray de cloridrato de lidocaína 2% ao redor do tubérculo coxal. Após a preparação assética do local de recolha da amostra, uma agulha de aspirado de medula óssea (Árgon Medical Devices - DMNI1x0x) foi inserida no tubérculo coxal a uma profundidade de 3-4 cm. Uma seringa heparinizada de 20 ml (1 ml de heparina) foi acoplada à agulha para obtenção da medula óssea.

Foram realizados em média, por animal, 4 esfregaços no momento da colheita e foram realizados mais 2 esfregaços no laboratório INNO sendo avaliadas cerca de 300 células por lâmina no microscópio NIKON Eclipse 600 utilizando as objectivas 10X, 20X, 50X e 100x de óleo de imersão.

3.6. Exame imagiológico – Microtomografia Computorizada

3.6.1 Colheita das amostras vertebrais

De forma a auxiliar o diagnóstico de osteoporose, foi realizado uma micro-TC de todas as vertebrae lombares nos dois grupos de animais, controlo e experimental.

As amostras foram mantidas em condições ideais de humidade, tendo sido envolvidas em papel de filtro embebido numa solução salina.

As amostras utilizadas para análise foram obtidas com trefina 6 mm de diâmetro x 6 mm de profundidade ao nível do corpo das vértebras L1 a L7.

3.6.2 Análise imagiológica por micro-TC

As amostras das vértebras de L1 a L7 foram alvo de um exame usando microtomografia de varredura de raios-X (micro-TC; SkyScan 1272; Bruecker, Kontich, Bélgica). As séries de projeções bidimensionais, com uma resolução de 7 µm, foram adquiridas a partir de uma rotação de 180°, com uma precisão de rotação de 0,45°, por aquisição a partir de um feixe de cone, utilizando um filtro conjunto de cobre com 0,35 mm e alumínio de 0,15 mm.

Os dados foram compilados usando o software NRecon (Skyscan, versão: 1.6.6.0) e analisados no analisador de exames de TC (Skyscan, versão 1.4). A região de interesse (ROI) foi definida como um círculo de 4,5 mm de diâmetro centrado sobre a amostra. Por autointerpelação da ROI, definida manualmente com os limites interno e externo ao nível do osso trabecular, foi alvo de uma reconstrução computacional que resultou no volume de interesse (VOI) com uma forma de cilindro representativo da amostra, que serviu de base essencial para as análises ósseas quantitativas. A DMO (g/mm^3) de cada amostra foi determinada utilizando os calibradores com dimensões de 8 mm (0,25, 0,75 g/mm^3), digitalizados nas mesmas condições que as amostras das vértebras. A fração de volume ósseo (BV/TV;%), espessura trabecular (Tb.Th; μm), volume ósseo/superfície óssea (BS/BV;%), número trabecular (Tb.N;1/mm) e espaçamento trabecular (Tb.Sp ;mm) foram calculados usando a ferramenta Batman, integrada no software de análise da TC.

Numa última fase, as imagens já compiladas foram alvo de uma renderização, originando imagens 3D utilizando o software CTVOX.

A micro-TC foi realizada com o apoio do Grupo 3B's.

3.7. Análise estatística dos dados

A elaboração da base de dados dos resultados do presente estudo foi realizada na folha de cálculo Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, EUA). Para a posterior análise estatística recorreu-se ao programa de análise estatística JMP 13 (New York, USA).

A estatística descritiva de todos os parâmetros descritos nas Tabelas 3 a 7, teve como base uma análise não paramétrica dado o número da amostra ser reduzido e não se verificar a normalidade dos dados.

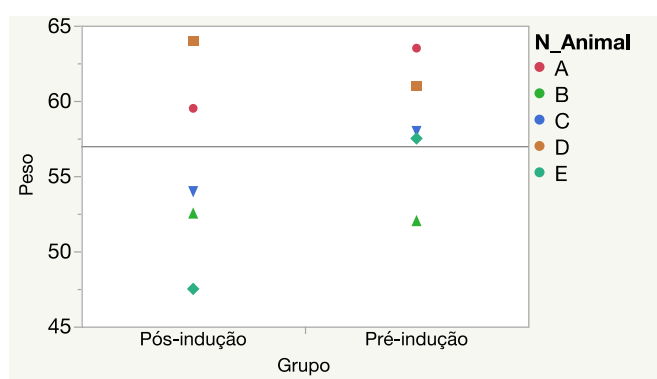
Na análise estatística dos dados do grupo controlo apenas se realizou a distribuição dos dados.

A diferença entre os grupos de dados dos animais do grupo experimental foi considerada estatisticamente significativa para valor de $p < 0,05$ (Teste T de Student).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra estudada

A amostra em estudo contemplou onze ovelhas da raça Serra da Estrela, com idade média de 4 anos. Quanto à variante peso, a média verificada antes da indução da osteoporose foi de 58,4 kilogramas e após a indução da osteoporose verificou-se uma média de peso de 55,5 kilogramas. Na Figura 3 é possível observar a variação de peso de cada animal nos diferentes grupos.



4.2. Avaliação dos efeitos do modelo induzido nos ovinos

4.2.1. Caracterização dos resultados da análise hematológica

Para cada parâmetro hematológico, descritos na Tabela 3, é discriminado o valor médio do grupo da pré e pós indução da osteoporose, as respetivas médias conjuntas, o desvio padrão, coeficiente de variação (CV), o teste de Shapiro-Wilk (W), valor de p e os valores de referência para a espécie ovina sempre que possível.

Dentro dos parâmetros que se revelaram estatisticamente significativos são englobados os eritrócitos totais com uma diminuição do valor de $10,14 \times 10^6/\mu\text{L}$ para $8,21 \times 10^6/\mu\text{L}$ (valor de p: 0,01), VCM com um aumento do valor de 39,7fL para 48,94 fL (valor de p: 0,01), HCM com aumento do valor de 11,06 pg para 12,88 pg (valor de p: 0,01), neutrófilos segmentados com aumento do valor de $3,01 \times 10^3/\mu\text{L}$ para $6,35 \times 10^3/\mu\text{L}$ (valor de p: 0,04), monócitos com aumento do valor de $0,22 \times 10^3/\mu\text{L}$ para $2,86 \times 10^3/\mu\text{L}$ (valor de p: 0,01) e os eosinófilos com uma diminuição do valor de $0,31 \times 10^3/\mu\text{L}$ para $0,05 \times 10^3/\mu\text{L}$ (valor de p: 0,01).

Figura 3. Comparação do peso de cada animal no grupo pré-indução e pós-indução da osteoporose.

Tabela 3. Resultados obtidos na análise dos parâmetros hematológicos.

^(a) (Weiss & Wardrop, 2010; Dias *et al.*, 2010).

Parâmetros Hematológicos	Grupo: Pré-Indução	Grupo: Pós-Indução	Média (Grupo pré e pós-indução)	Desvio Padrão	CV	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)	Referência da espécie Ovina ^(a)
ERITOGRAMA								
Eritrócitos totais (RBC) (x10 ⁶ /μL)	10,14	8,21	9,18	1,57	17,1	0,87	0,01*	9-15
Hemoglobina (g/dl)	11,2	10,54	10,87	1,36	12,55	0,94	0,832	9-15
Hematócrito (%)	40,28	40,06	40,17	5,84	14,55	0,93	0,674	27-45
VCM (fL)	39,7	48,94	44,32	5,79	13,07	0,91	0,011*	28-40
HCM (pg)	11,06	12,88	11,97	1,19	9,92	0,97	0,011*	8-12
CHCM (%)	28,02	26,32	27,17	1,46	5,39	0,83	0,058	31-34
RDW (μm)	26,82	23,96	25,39	2,34	9,20	0,89	0,093	3.2-6.0
Parâmetros Hematológicos	Grupo: Pré-	Grupo: Pós-	Média (Grupo	Desvio Padrão	CV	W	Valor de p (*estatisticamente	Referência da espécie

	Indução	Indução	pré e pós-indução)				significativo)	Ovina ^(a)
Plaquetas totais (x10 ³ /μL)	372,2	414,75	391,1	95,10	24,32	0,95	0,712	300-800
LEUCOGRAMA								
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)	7,38	9,87	8,62	2,41	28,01	0,84	0,208	4.0-8.0
Neutrófilos (banda)	-	-	-	-	-	-	-	Raros
Neutrófilos (segmentados) (x10 ³ /μL)	3,01	6,35	4,68	2,66	56,88	0,82	0,046*	0.7-6.0
Linfócitos (x10 ³ /μL)	3,82	2,86	3,34	0,77	23,01	0,89	0,142	2.0-9.0
Monócitos (x10 ³ /μL)	0,22	2,86	0,41	0,24	57,97	0,93	0,015*	0-0.75
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	0,31	0,05	0,18	0,15	86,62	0,89	0,011*	0-1.0
Parâmetros Hematológicos	Grupo: Pré-Indução	Grupo: Pós-Indução	Média (Grupo pré e pós-	Desvio Padrão	CV	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)	Referência da espécie Ovina ^(a)

			indução)					
Basófilos (x10³/μL)	0,02	0,01	0,01	0,01	60,23	0,71	0,722	0-0.3

4.2.2 Caracterização dos resultados da análise citológica de medula óssea

Para cada parâmetro da análise citológica de medula óssea, descritos na Tabela 4, são igualmente mencionados os dados acima referidos nas tabelas anteriores.

O tratamento estatístico revelou não existir nenhum parâmetro estatisticamente significativo para este estudo.

Tabela 4. Resultados obtidos na análise citológica de medula óssea.^(c) (Izzi *et al.*, 2007)

Análise Citológica de Medula Óssea	Grupo: Pré-Indução	Grupo: Pós-Indução	Média (Grupo pré e pós-indução)	Desvio Padrão	CV	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)	Referência da espécie Ovina ^(c)
Mieloblastos e promielócitos (%)	2,8	3,15	2,9	0,64	22,26	0,89	0,695	2,62-3,38
Mielócitos, metamielócitos e granulócitos segmentados (%)	33,02	31,7	32,64	1,89	5,78	0,94	0,561	25,58-35,39
Rubriblastos e prorubricitos (%)	2,06	3,55	2,49	1,01	40,72	0,70	0,171	1,59-2,49
Rubricitos e metarubricitos (%)	53,36	52,95	53,24	3,26	6,12	0,93	0,845	49,02-58,36
Linfócitos (%)	1,76	0,65	1,44	0,79	53,96	0,95	0,118	1,29-2,47
Eosinófilos (%)	6,45	7,55	6,76	3,01	45,50	0,88	0,561	3,35-11,37
Basófilos (%)	0	0	0	0	-	-	1,000	0-0,39
Plasmócitos (%)	0,4	0,19	0,34	0,36	105,57	0,88	0,843	0,09-0,39
Macrófagos (%)	0,16	0,35	0,21	0,21	98,73	0,84	0,417	0,32-0,88
Análise Citológica de Medula Óssea	Grupo: Pré-Indução	Grupo: Pós-Indução	Média (Grupo pré e pós-indução)	Desvio Padrão	CV	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)	Referência da espécie ⁴⁴

	Indução	Indução	e pós- indução)				significativo)	Ovina^(c)
Megacariócitos (%)	0,48	0,55	0,5	0,08	16,33	0,86	0,412	0,12-0,52
Ratio mielóide/eritroide (%)	0,77	0,62	0,72	0,12	16,39	0,89	0,081	0,65-0,81

4.3. Avaliação da condição de osteoporose

4.3.1. Caracterização dos resultados da análise bioquímica sérica

Para cada parâmetro bioquímico, descritos na Tabela 6, são igualmente mencionados os dados acima referidos na tabela anterior.

Os parâmetros que se revelaram estatisticamente significativos foram a creatinina com uma diminuição do valor de 0,85 mg/dL para 0,68 mg/dL (valor de $p:0,01$), GGT com um aumento do valor de 56,2 U/L para 78,4 U/L (valor de $p: 0,01$), albumina com uma diminuição do valor de 3,56 g/dL para 2,93 g/dL (valor de $p: 0,04$) e Alfa 1 Globulina com um aumento do valor de 0,33 g/dL para 0,39 g/dL (valor de $p: 0,02$).

Tabela 5. Resultados obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos no Grupo Controlo.

^(b) (Jackson & Cockcroft, 2002).

Parâmetros Bioquímicos	Grupo: Pré-Indução	Grupo: Pós-Indução	Média (Grupo pré e pós-Indução)	Desvio Padrão	CV Média (Grupo Controlo Inicial e Final)	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)	Referência da espécie Ovina ^(b)
		Inicial	Final					
ENZIMAS								
Fosfatase Alcalina (U/L)		101	150		125,5	54,27	0,80	68-387
MINERAIS								
Cálcio Total (mmol/L)		2,37	2,27		2,32	0,13	0,86	2.88-3.20
Fósforo (mmol/L)		1,73	1,89		1,81	0,41	0,98	1.62-2.36
Magnésio (mmol/L)		0,95	1		0,98	0,08	0,85	0.90-1.26
MARCADOR REABSORÇÃO ÓSSEA								
TRAP (U/L)		2,16	2,27		2,22	0,31	0,93	0,14-5,9

Tabela 6. Resultados obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos.

^(b) (Jackson & Cockcroft, 2002).

METABOLITOS								
Glicose (mg/dL)	57,8	50,2	56,95	6,48	9,42	0,86	0,059	50-80
Colesterol (mg/dL)	67,8	59,6	63,7	13,78	21,64	0,86	0,599	43-103
FUNÇÃO RENAL								
Ureia (mg/dL)	33	46,6	39,8	11,10	27,90	0,96	0,092	10-35
Creatinina (mg/dL)	0,85	0,68	0,77	0,12	15,06	0,94	0,015 *	1.2-1.9
ENZIMAS								
Aspartato aminotransferase(AST) (U/L)	142,8	172,2	157,5	52,66	33,43	0,72	0,832	60-280
Alanina aminotransferase(ALT)(U/L)	29	28,2	28,6	8,06	28,18	0,91	0,599	22-38
γ- Glutamil transferase (GGT) (U/L)	56,2	78,4	67,3	14,61	21,70	0,85	0,014*	20-52
Fosfatase Alcalina (U/L)	86,2	110,8	98,5	29,46	29,91	0,93	0,247	68-387
Parâmetros Bioquímicos	Grupo: Pré-Indução	Grupo: Pós-Indução	Média (Grupo pré e pós-indução)	Desvio Padrão	CV	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)	Referência da espécie Ovina ^(b)
MINERAIS								
Cálcio Total (mmol/L)	2,33	2,12	2,22	0,26	11,60	0,84	0,141	2.88-3.20

Fósforo (mmol/L)	2,01	2,33	2,27	0,60	26,30	0,94	0,675	1.62-2.36
Magnésio (mmol/L)	0,94	1,05	0,99	0,10	9,80	0,91	0,093	0.90-1.26
PROTEÍNAS								
Proteínas Totais (g/dL)	7,3	6,44	6,87	0,72	10,45	0,84	0,057	6-7.9
Albumina (g/dL)	3,56	2,93	3,24	0,48	14,77	0,87	0,045*	2.4-3
Alfa 1 Globulina (g/dL)	0,33	0,39	0,36	0,05	12,69	0,92	0,023*	
Alfa 2 Globulina (g/dL)	0,81	0,80	0,81	0,06	7,75	0,93	0,751	
Beta Globulina (g/dL)	0,43	0,49	0,46	0,12	25,95	0,92	0,396	
Gama Globulina (g/dL)	2,17	1,84	2,01	0,61	30,65	0,91	0,247	
MARCADOR REABSORÇÃO ÓSSEA								
TRAP (U/L)	2,32	2,64	2,48	0,40	16,33	0,84	0,287	0,14-5,9
ELECTRÓLITOS								
Sódio (mmol/L)	151	149,4	150,2	1,75	1,17	0,96	0,133	145-152
Potássio(mmol/L)	4,94	4,7	4,82	0,74	15,33	0,78	0,833	3.9-5.4
Cloretos(mmol/L)	108,4	103,8	106,1	3,60	3,40	0,88	0,088	95-103

4.3.2. Caracterização dos resultados da análise da Microtomografia Computorizada

Para cada parâmetro da análise da micro-TC, descritos na Tabela 7, são igualmente mencionados os dados acima referidos nas tabelas anteriores.

Os parâmetros que se revelaram estatisticamente significativos englobaram o volume ósseo com uma diminuição de 10% (valor de p : 0,01), número trabecular com uma diminuição de 16% (valor de p : 0,01), espaçamento trabecular com aumento de 12% (valor de p : 0,02) e a porosidade total com um aumento de 8% (valor de p : 0,01).

Tabela 7. Resultados obtidos na análise dos parâmetros obtidos na micro-TC

Parâmetros Micro-TC	Grupo: Controlo	Grupo: Experimental	Média (Grupo Controlo e Experimental)	Desvio Padrão	W	Valor de p (*estatisticamente significativo)
Volume Ósseo (%)	44,21	39,61	41,91	7,43	0,94	0,011*
Ratio superfície/volume ósseo (%)	17,89	18,55	18,22	1,76	0,95	0,105
Espessura Trabecular (µm)	0,14	0,15	0,15	0,02	0,98	0,090
Número Trabecular (1/mm)	3,31	2,79	3,05	0,84	0,96	0,010*
Espaçamento Trabecular (mm)	0,37	0,42	0,40	0,08	0,80	0,022*
Porosidade Total (%)	55,79	60,39	58,09	7,43	0,94	0,011*
DMO (g/mm³)	0,59	0,55	0,57	0,14	0,95	0,282

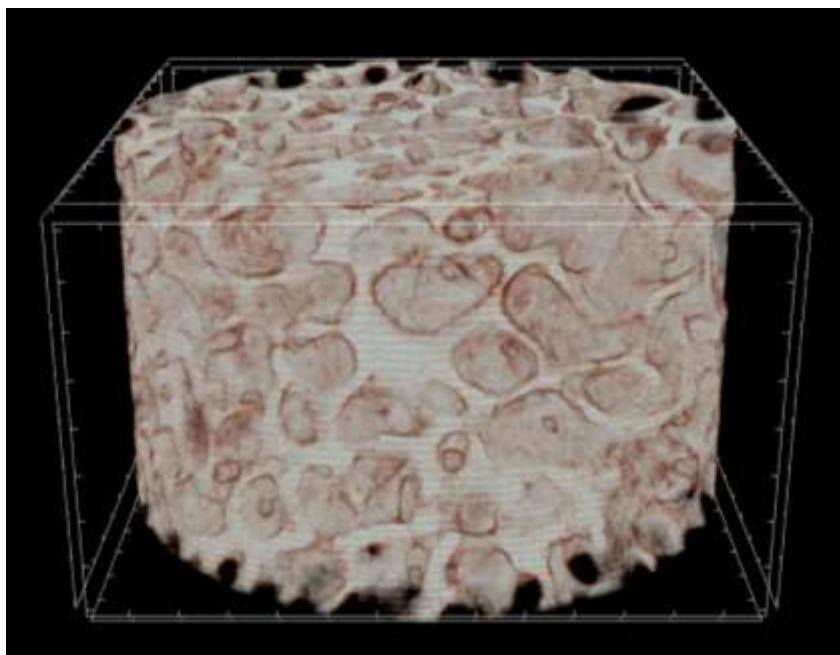


Figura 4. Imagem tridimensional do corpo vertebral de um animal do grupo experimental utilizando a técnica de micro-TC, gentilmente cedida pelo Dr. Pedro Babo pertencente ao Grupo 3 B's.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo realizado em ovelhas da raça Serra da Estrela permitiu realizar exames complementares que contribuíram para a avaliação da presença da condição de osteoporose e permitiram avaliar o efeito do modelo induzido nos animais para a sua caracterização. Para além disso, foi também possível realizar uma comparação da variável peso nos dois momentos, verificando-se uma diminuição do peso no final do protocolo experimental podendo ter como causa a perda de massa óssea e perda de massa muscular.

Relativamente aos parâmetros bioquímicos estudados, o uso de corticosteroides pode estar associado a uma hiperglicemia que pode ser provocada pelo aumento da produção de glicose, estimulando a glucogenólise e a gluconeogénese ou pela resistência à insulina dado que os corticosteroides são antagonistas da insulina e diminuem a absorção e o uso de glicose pelos tecidos. Estes efeitos estão associados à proteólise muscular e às anormalidades do metabolismo lipídico, combinando lipólise e lipogénese (Longui, 2007). Desta forma, pode ocorrer o aparecimento de diabetes, considerado moderado, relacionado com a dose e duração da administração. Esta condição, normalmente é reversível com o término da administração de corticoides, embora em situações de predisposição genética, os indivíduos possam permanecer diabéticos (Longui, 2007).

A hiperglicemia quando associada ao efeito imunossupressor dos corticosteroides, pode aumentar significativamente o risco de ocorrência de infeções. Os fatores de risco para o desenvolvimento da hiperglicemia descrita incluem a dose de esteroides, peso corporal, idade e genética do paciente (Nowak & Papierska, 2014).

No presente estudo, não se verificou a existência de hiperglicemia, mas uma diminuição da glicose no grupo pós-indução da osteoporose mantendo-se no intervalo dos parâmetros normais para a espécie (50-80 mg/dL).

Em diversos estudos foi observado um aumento do colesterol no grupo da pós-indução da osteoporose, devido a uma alteração lipídica baseada no aumento de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL e LDL), tendo como consequência um incremento dos níveis séricos de colesterol e triglicéridos (Latimer, 2011), facto não ocorrido no nosso estudo, mantendo-se o valor de colesterol dentro dos parâmetros de referência (43-103 mg/dL), embora inferiores ao grupo da pré-indução da osteoporose.

No caso da creatinina, os valores encontram-se abaixo do normal que poderá ser justificado com a diminuição da massa muscular que ocorre na osteoporose.

Relativamente ao metabolismo proteico, ocorre um balanço negativo, havendo um aumento da síntese de enzimas específicas como a AST e ALT e aumento do catabolismo proteico nos músculos, epiderme e tecido conjuntivo. No presente estudo, apesar das enzimas se encontrarem dentro dos parâmetros normais, apenas se verificou aumento da enzima AST e uma ligeira diminuição da ALT. Como os glucocorticoides provocam lesões hepáticas seria de esperar que no presente estudo a enzima ALT também se encontrasse aumentada, como acontece no caso da AST, GGT e fosfatase alcalina que são indicadores do estado hepático, mas em ruminantes a concentração de ALT no citoplasma dos hepatócitos é baixa não sendo assim uma análise fiável nesta espécie (Thrall *et al.*, 2015).

No presente estudo o valor da fosfatase alcalina encontrou-se dentro dos parâmetros normais (68-387 U/L), havendo um aumento da média no grupo da pós-indução da osteoporose comparativamente ao grupo da pré-indução, pois os glucocorticoides induzem a sua atividade (Latimer, 2011).

No que se refere à GGT, tal como à fosfatase alcalina, encontra-se predominantemente associada aos hepatócitos, células epiteliais biliares, células epiteliais tubulares renais e células epiteliais mamárias. O seu aumento na contagem no soro resulta da indução enzimática envolvendo os hepatócitos ou células epiteliais biliares, pois os

corticosteroides são agressivos em termos hepáticos. Na presença de colestase, provocada por compressão do canalículo biliar e aumento hepatocelular. Ocorre também um aumento de GGT no soro mensurado, sendo mais sensível quando comparado à fosfatase alcalina (Latimer, 2011).

Os corticosteroides provocam também alterações nos valores de cálcio, ocorrendo uma diminuição da absorção intestinal de cálcio que acabará por resultar num hiperparatireoidismo secundário provocando, conseqüentemente, o aumento da reabsorção óssea. Esta diminuição da absorção de cálcio poderá ter duas causas associadas: a primeira poderá ser provocada pela diminuição da hidroxilação/ativação renal do composto principal da vitamina D e, a segunda, poderá estar relacionada com um efeito independente da vitamina D no transporte do cálcio. Por outro lado, a excreção renal do cálcio é aumentada devido ao efeito mediado por corticosteroides na reabsorção tubular renal de cálcio (Buchman, 2001). No presente estudo foi observada uma ligeira diminuição do cálcio total, encontrando-se abaixo dos parâmetros de referência dos ovinos, embora inicialmente os animais apresentassem também valores inferiores aos normais (Klein, 2015).

Quanto à TRAP, o seu valor sofreu um aumento no grupo da pós-indução da osteoporose comparativamente ao grupo da pré-indução, como seria expectável, que poderá ser provocado pela atividade osteoclástica e, conseqüente, osteopenia (Sousa *et al.*, 2011). A análise englobou o estudo das suas duas isoformas, a 5a e 5b. Em mulheres de idade avançada, o aumento deste parâmetro está associado à osteoporose.

No que toca ao sódio e à água, os glucocorticoides provocam um aumento da sua excreção como consequência dos seus efeitos na produção do peptídeo atrial natriurético e no fluxo glomerular renal. No presente estudo, foi possível verificar uma diminuição do sódio, mas mantendo-se dentro dos parâmetros relatados na espécie ovina (145-152 mmol/L) (Latimer, 2011).

O potássio, apesar de se encontrar dentro dos parâmetros normais para a espécie (3.9-5.4 mmol/L), no grupo pós-indução da osteoporose verificou-se uma ligeira diminuição dos valores, possivelmente contrabalançando com o aumento dos seus níveis circulantes provenientes do catabolismo proteico celular. No caso da terapia de corticosteroides tivesse sido realizada com hidrocortisona, prednidona ou prednisolona, seria de esperar uma hipocalémia dado o seu efeito mineralocorticoide. No presente estudo não se verificou a presença de hipocalémia uma vez que a dexametasona não possui efeito mineralocorticoide (Nowak & Papierska, 2014).

Os corticosteroides demonstram também inibir a produção de células B e de imunoglobulinas (Poetker & Reh, 2010), como é possível verificar na Tabela 6 no valor de gama globulina que é composta maioritariamente pela imunoglobulina G e pelas imunoglobulinas A, M, D e E (Poetker & Reh, 2010).

A osteoporose é caracterizada pela diminuição da DMO acompanhada da deterioração da microarquitetura óssea. A micro-CT tem-se revelado relevante na investigação da caracterização da qualidade óssea (Wu *et al.*, 2008). No final do presente estudo, foi possível verificar diferenças na massa óssea e na estrutura óssea.

Nos humanos, as alterações anuais de DMO durante a menopausa atingem os 3% a 10%. No caso da osteoporose induzida com recurso a glucocorticoides, a redução pode atingir os 12% no primeiro ano de tratamento (Wu *et al.*, 2008). No nosso estudo, a DMO teve uma redução de 7% no grupo experimental, mas no caso da ovelha a redução pode atingir 30% ou mais sendo considerada uma perda substancial de osso. Mas seria necessária uma redução de pelo menos 25% para caracterizarmos o nosso modelo como modelo osteoporótico (Lill *et al.*, 2002). A DMO é utilizada para determinar a extensão da perda óssea e verificar a eficácia da prevenção e tratamento (Wu *et al.*, 2008).

Outro fator, como a arquitetura trabecular, revela-se importante para a manutenção da integridade mecânica do osso e, podemos verificar neste estudo, a diminuição do número trabecular, conjugado com o aumento do espaçamento trabecular e da porosidade total e uma diminuição de 10% do volume ósseo, que revelam uma fragilidade do tecido ósseo e, consequentemente uma maior probabilidade de ocorrência de fraturas ósseas.

Na osteoporose induzida por glucocorticoides a formação óssea é diminuída e a reabsorção óssea é aumentada (Lill *et al.*, 2002). Este efeito pode ser a explicação para a perda óssea ocorrer rapidamente nesta condição. De acordo com o estudo de Lill *et al.*, 2008, aquando da ocorrência de perda óssea, o osso trabecular é afetado mais cedo e severamente pelos corticosteroides, do que o osso cortical.

O principal desafio associado ao estudo aqui descrito utilizando modelos ovinos prende-se com o facto de não obterem naturalmente o mesmo grau de perda óssea na sua vida adulta (3-8 anos) comparativamente ao ser humano com um período de dez vezes maior de desenvolvimento (Zarrinkalam *et al.*, 2009). Logo, este modelo não reproduz exatamente a osteopenia que ocorre na osteoporose em seres humanos, mas demonstra ser um modelo com capacidade para representar uma perda óssea significativa num curto

espaço de tempo podendo ser utilizado em ensaios pré-clínicos de tratamentos farmacológicos ou cirúrgicos em humanos (Zarrinkalam *et al.*, 2009).

Relativamente aos parâmetros hematológicos, quer a série de eritrócitos quer a série de leucócitos, apresentaram alguns valores alterados comparativamente aos valores de referência para a espécie estudada.

No que toca aos efeitos secundários hematopoiéticos/imunológicos, os corticosteroides promovem um aumento dos leucócitos totais, como verificado no presente estudo, devido ao aumento do número de neutrófilos à medida que vão sendo transferidos do compartimento marginal para o compartimento circulante uma vez que ocorre um aumento da libertação da medula óssea de neutrófilos maduros e a redução da saída de neutrófilos da circulação para o foco inflamatório (Latimer, 2011). Por outro lado, os corticosteroides possuem um efeito negativo sobre os neutrófilos, reduzindo a sua adesão ao endotélio vascular e a sua atividade bactericida. Estes inibiam ainda a função dos macrófagos, limitando a quimiotaxia, a fagocitose e a libertação de citocinas (fator de necrose tumoral e interleucina-1) (Poetker & Reh, 2010).

No entanto, ocorre uma diminuição de outros leucócitos, nomeadamente de linfócitos, basófilos e eosinófilos. As causas para a ocorrência de uma linfopenia devem-se à redistribuição dos linfócitos circulantes, permanecendo temporariamente sequestrados nos tecidos linfoides ou na medula óssea em vez de circularem para a circulação linfática ou para o sangue. O uso prolongado de corticosteroides pode provocar a lise de linfócitos tímicos corticais e de linfócitos presentes nos gânglios linfáticos. Os linfócitos tímicos medulares e os linfócitos localizados na medula óssea resistem à lise descrita (Poetker & Reh, 2010) (Latimer, 2011).

No caso dos eosinófilos, apesar de no presente estudo os valores se encontrarem no intervalo de referência ($0-1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$), ocorreu uma diminuição significativa dos valores para o grupo da pós-indução da osteoporose. Este facto, pode ser provocado pelo sequestro dos eosinófilos nos tecidos, que retomarão à circulação após o término da administração de glucocorticoides, pela inibição da libertação de eosinófilos da medula óssea apesar da sua produção continuar a ser realizada, pela apoptose induzida dos eosinófilos ou a produção de citocinas (interleucina-3 e interleucina-5) que promovem o crescimento e a função dos eosinófilos podem estar diminuídas (Weiss & Wardrop, 2010) (Latimer, 2011).

No caso dos basófilos, os glucocorticoides inibem a libertação de histamina e de leucotrienos, mas os mastócitos são bastante resistentes aos seus efeitos embora possa ocorrer uma diminuição do seu número e da sua migração (Latimer, 2011).

A monocitose, por sua vez, é causada por um efeito semelhante ao que ocorre no caso dos neutrófilos, isto é, a mobilização de células do compartimento marginal para a vasculatura sanguínea (Poetker & Reh, 2010).

A resposta máxima aos glucocorticoides ocorre quatro a oito horas após a sua administração, sendo que o leucograma retoma aos valores de referência num intervalo de 24 horas, aquando de uma única injeção de glucocorticoides de ação curta e, dois a três dias após a cessação da administração a longo prazo, ou seja, dez ou mais dias (Nowak & Papierska, 2014).

Os glucocorticóides podem ter vários efeitos nas células ósseas, dependendo do estado da diferenciação celular, das espécies de animais e da dose e duração do tratamento com corticosteróides. Dentro da mesma população, diferentes indivíduos podem ter efeitos colaterais diferentes dependendo da cinética ou das diferentes concentrações plasmáticas das proteínas que transportam o fármaco. No caso da medula óssea humana, ocorre uma inibição da síntese da matriz (Pountos *et al.*, 2010) (Lin & Fan, 2010).

6. CONCLUSÃO

A osteoporose é considerada um grave problema de saúde afetando milhares de pessoas em todo o mundo, sendo alvo de diversos estudos científicos.

A utilização de modelos animais, contribui grandemente para um estudo mais amplo dos seus mecanismos fisiopatológicos permitindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Como a ovariectomia induz uma diminuição significativa da densidade óssea em ovinos, mas muito menor comparativamente à osteoporose humana, foi necessário desenvolver um protocolo de indução combinando diversos fatores de risco conhecidos para osteoporose, como a deficiência de estrogénio e tratamento com altas doses de corticosteroides, como recomendado pela FDA.

Em suma, a ovelha é um importante modelo experimental em estudos relacionados com osteoporose em medicina humana apresentando alterações significativas na microarquitetura óssea e é o único modelo de grandes animais que poderá apresentar alterações de mais de 30% na DMO.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As limitações do presente estudo incluem a presença de hemodiluição em algumas amostras de medula óssea não permitindo a sua quantificação, proporção e respetiva interpretação, a não homogeneidade de idades dos animais, a perda de três animais do grupo experimental e, conseqüentemente, o baixo número de animais incluídos no estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, S., Adsul, N., Palukuri, N., & Acharya, A.S. (2017). Caveats in diagnosis of osteoporosis. *Indian Journal of Medical Specialities*, 8, 169-174.
- Acton, Q.A. (2013). Bone Marrow Cells – Advances in Research and Application. *Scholarly Editions* (pp. 33-36).
- Aguilar, E. A., Barry, S. D., Cefalu, C. A., Abdo, A., Hudson, W. H., Campbell, J. S., & Reske, T. M. (2015) Osteoporosis Diagnosis and Management in Long-Term Care Facility. *The American Journal of the Medical Sciences*, 350, 357-363.
- Alatalo, S. L., Peng, Z., Janckila, A. J., Kaija, H., Vihko, P., Vaananen, H. K., & Halleen, J. M. (2003). A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(1), 134-139.
- Al-Fartosi, K.G., Talib, Y.J., & Ali, S. (2010). Comparative study of some Serum Biochemical parameters of cattle and sheep of the marshes in the south of Iraq. *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine.Science.*, 9, 79-84.
- Alejandro, P., & Constantinescu, F. (2017). A Review of Osteoporosis in the Older Adult. *Clinics in Geriatric Medicine*, 33, 27-40.
- Alves, A. (2010). Bone Marrow Histology. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31.
- Bandeira, L., & Bilezikian, J.P. (2016). Novel Therapies for Postmenopausal Osteoporosis. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 46(1), 207-219.
- Baofeng, L., Zhi, Y., Bei, C., Guolin, M., Qingshui, Y., & Jian, L. (2010). Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthopaedica*, 81, 396–401.
- Barco, C. M. R., Arija, S. M., & Pérez, M. R. (2012). Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatología Clínica*, 8(2), 149-152.

- Brain, B.J., Clark, D.M., & Wilkins, B.S. (2010). Bone Marrow Pathology. *Wiley-Blackwell* (4ªed, cap.1, pp. 20-22).
- Buchamn, A. (2001). Side Effects of Corticosteroid Therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 33(4), 289–294.
- Burket, J. C., Brooks, D. J., MacLeay, J. M., Baker, S. P., Boskey, A. L., & Meulen, M. C. (2013). Variations in nanomechanical properties and tissue composition within trabeculae from an ovine model of osteoporosis and treatment. *Bone*, 52, 326-336.
- Camassa, J.A., Diogo, C.C., Sousa, C.P., Azevedo, J.T., Viegas, C.A., Reis, R.L., Dourado, N., & Dias, I.R. (2017). Bone turnover markers in sheep and goat: A review of the scientific literature. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(2), 1049-1061.
- Campbell, G., Buie, H., & Boyd, S. (2008). Signs of irreversible architectural changes occur early in the development of experimental osteoporosis as assessed by in vivo micro-CT. *Osteoporosis International*, 19, 1409–1419.
- Canalis, E., Mazziotti, G., Giustina, A., & Bilezikian, P. (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis International*, 18, 1319-1328.
- Cohen, A. (2016). Premenopausal osteoporosis. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 46, 117-133.
- Cruz, D. T., Ribeiro, L. C., Vieira, M., Teixeira, M. T. B., Bastos, R. R., & Leite, I. C. G. (2012). Prevalência de quedas e fatores associados em idosos. *Revista Saúde Pública*, 46(1),138-46.
- Curtis, E., Moon, R., Harvey, N. C., & Cooper C. (2017). The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. *International Journal of Orthopaedic and Trauma Nursing*, 26, 7-17.
- Desantis, S., Accogli, G., Zizza, S., Mastrodonato, M., & Blasi, A. (2015). Ultrastructural study of cultured ovine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Annals of Anatomy*, 201, 43-49.

Devia, D.G., Liberos, C.Z., & Calderón, W.K. (2010). Vitamin D insufficiency in adults patients with low bone mass and osteoporosis in the Fundación Santa Fe de Bogotá 2008-2009. *Revista Colombiana de Reumatología*, 17, 212-218.

Dias, I.R., Viegas, C.A., Silva, A.M., Pereira, H.F., Sousa, C.P., Carvalho, P.P., et al. (2010). Haematological and biochemical parameters in Churra-da-Terra-Quente ewes from the northeast of Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 265-272.

Donos, N., Dereka, X., & Mardas, N. (2015). Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontology 2000*, 68, 99-121.

Drake, R., Vogl W., & Mitchell A.W.M. (2015). Gray's Anatomy for Students. *Churchill Livingstone* (3^aed, cap.1, pp. 13-17).

Eastell, R. (2016). Identification and management of osteoporosis in older adults. *Medicine*, 45, 55-61.

Eschler, A., Ropenack, P., Herlyn, P. K. E., Roesner, J., Pille, K., Busing, K., & Vollmar, B., et al. (2015). The standardized creation of a lumbar spine vertebral compression fracture in a sheep osteoporosis model induced by ovariectomy, corticosteroid therapy and calcium/phosphorus/vitamin D-deficient diet. *Injury*, 4654, 17-23.

Etim, N.N., Williams, M.E., Akpabio, U., & Offiong, E.E.A. (2014). Haematological Parameters and Factors Affecting Their Values. *Agricultural Science*, 2, 37-47.

Farias, L.T. M., Lago, C. L., & Andrade, J. C. S. (2015). Osteoporose, uma análise fisiopatológica voltada para os profissionais de enfermagem. *Revista Enfermagem Contemporânea*, 4(2), 222-236.

Faot, F., Chatterjee, M., Camargos, G.V., Duyck, J., & Vandamme, K. (2015). Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review. *Bone Reports*, 2, 14-24.

Fattore, A.D., Capannolo, M., & Rucci, N. (2010). Bone and bone marrow: The same organ. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 503, 28-34.

Gaivoronskiy, I.V., Kurtseva, A. A., Gaivoronskaya, M.G., & Nichiporuk, G.I. (2014). Anatomy of Bone System. The manual for medical students. *L-Print* (1ªed, cap.1, pp.8-9).

Gallagher, J.C., & Tella, S.H. (2013). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1-16.

Genant, H., Engelke, K., Prevrhal, S. (2008). Advanced CT bone imaging in osteoporosis. *Rheumatology*, 47, 9-16.

Govindarajan, P., Bocker, W., Kampschulte, M., Schlewitz, G., Huerter, B., Sommer, U., Durselen, L., *et al.* (2014). Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *American Journal of Pathology*, 184, 765–777.

Guillot, X. (2015). Les différents types d'ostéoporose et leurs stratégies thérapeutiques. *Elsevier Masson SAS*, 549, 18-22.

Izzi, S. A. L. A., Gawas, M.M., & Belhaj, K. M. (2007). Cytochemistry of sheep bone marrow cells. *Veterinarski Arhiv*, 77 (5), 387-396.

Jackson, P.G.G., & Cockcroft, P.D. (2002). Clinical Examination of Farm Animals. *Blackwell Science Ltd* (cap.3, pp.303-305).

Kalpakcioglu, B. B., Engelke, K., & Genant, H. K. (2011). Advanced imaging assessment of bone fragility in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*, 48, 1221-1231.

Kielbowicz, Z., Piatek, A., Biezyński, J., Skrzypczak, P., Kuropka, P., Kuryszko, J., Nikofem, A., *et al.* The experimental osteoporosis in sheep-clinical approach. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18, 645-654.

Kielbowicz, Z., Piatek, A., Kuropka, P., Mytnik, E., Nikodem, A., Biezyński, J., & Skrzypczak, P. (2016). Experimental osteoporosis in sheep – mechanical and histological approach. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19, 109-118.

Klein, G.L. (2015). The effect of glucocorticoids on bone and muscle. *Osteoporosis and Sarcopenia*, 1, 39-45.

Komori, T. (2015). Animal models for osteoporosis. *European Journal of Pharmacology*, 759, 287-294.

Latimer, K.S. (2011). Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. *Wiley-Blackwell* (5ªed. pp. 81-240).

Lawrence, M.E., Secreto, F.J., & Syed F.A. (2013). Animal Models for the Study of Human Disease. *Elsevier* (cap. 17, pp. 392-409).

Li, Y., Chen, S., Li, L., Qin, L., Wang, X., & Lai, Y. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3, 95-104.

Lill, C.A., Gerlach, C., Eckhardt, C., Goldhahn, J., & Schneider, E. (2002). Bone Changes due to Glucocorticoid Application in an Ovariectomized Animal Model for Fracture Treatment in Osteoporosis. *Osteoporosis International*, 13, 407-414.

Lill, C.A., Fluegel, A.K., & Schneider, E. (2002). Bone Changes due to Glucocorticoid Application in an Ovariectomized Animal Model for Fracture Treatment in Osteoporosis. *Osteoporosis International*, 13, 480-486.

Lin, S., Ouyang, T., & Kanekar, S. (2016). Imaging of Bone Marrow. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 945-971.

Longui, C.A. (2007). Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *Jornal de Pediatria*, 83, 163-171.

Macías, J. G., Montes, J. P., Olmos J. M., & Nogués, X. (2015). Clinical practice guidelines for postmenopausal, glucocorticoid-induced and male osteoporosis. Spanish Society for Research on Bone and Mineral Metabolism. *Revista Clínica Española*, 215(9), 515-526.

Muller, R., Campenhout, H.V., Damme, B.V., Perre, G.V., Dequeker, J., Hildebrand, T., & Rueggsergger, P. (1998). Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative

Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography. *Bone*, 23, 59-66.

Nguyen, V.H. (2016). Osteoporosis prevention and osteoporosis exercise in community-based public health programs. *Osteoporosis and Sarcopenia*, 3, 1-14.

Nowak, K.M., & Papierska, L. (2014). Prevention and monitoring of the side effects of chronic corticosteroid therapy. *Postępy Nauk Medycznych*, 12.

O'Connor, K.M. (2016). Evaluation and Treatment of Osteoporosis. *Medical Clinics*, 100, 807-826.

Oheim, R., Schinke, T., Amling, M., & Pogoda, P. (2016). Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation?. *Injury*, 47, 3-9.

Onasanya, G.O., Oke, F.O., Sanni, T.M., & Muhammad, A.I. (2015). Parameters Influencing Haematological, Serum and Bio-Chemical References in Livestock Animals under Different Management Systems. *Journal of Veterinary Medicine*, 5, 181-189.

Peralta, M. P., Cuellar, C. S., & Mejía, E. A. C. (2016). Efectos de la actividad física en la calidad de vida relacionada con la salud en adultos con osteopenia y osteoporosis: revisión sistemática y metaanálisis. *Fisioterapia*, 39, 83-92.

Perilli, E., Le, V., Ma, B., Salmon, P., Reynolds, K., & Fazzalari, N. L. (2010). Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporosis International*, 21, 1371-1382.

Pineda, B., Serna, E., Fernández, A. L., Noguera, I., Panch L., Hermenegildo, C., Tarín, J. J., et al. (2014). Gene expression profile induced by ovariectomy in bone marrow of mice: A functional approach to identify new candidate genes associated to osteoporosis risk in women. *Bone*, 65, 33-41.

Poetker, D.M., & Reh, D.D. (2010). A Comprehensive Review of the Adverse Effects of Systemic Corticosteroids. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 43, 753–768.

Pountos, I., Georgouli, T., Henshaw, K., Bird, H., Jones, E. & Giannoudis, P.V. (2010). The Effect of Bone Morphogenetic Protein-2, Bone Morphogenetic Protein-7, Parathyroid Hormone, and Platelet-Derived Growth Factor on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived From Osteoporotic Bone. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 24, 552-556.

Rizzo, D.C. (2016). Fundamentals of Anatomy and Physiology. *Cengage Learning* (4^a ed., cap. 7, pp.144). Boston.

Sattari, M., Cauley, J. A., Garvan, C., Johnson, K. C., LaMonte, M. J., Li, W., Limacher, M., Manini, T., *et al.* (2017). Osteoporosis in the Women's Health Initiative: Another Treatment Gap. *The American Journal of Medicine*, 130, 937-948.

Schreiber, J., Kamal, R.N., & Yao, J. (2017). Simple Assessment of Global Bone Density and Osteoporosis Screening Using Standard Radiographs of the Hand. *The Journal of Hand Surgery*, 42, 244-249.

Sousa, M.I.L, Oba, E., Uribe-Velásquez, L.F., & Ramos, A.A. (2002). Secreción diaria de estradiol, progesterona y FSH en ovejas durante el anestro estacional. *UNIPAR*, 5, 15-20.

Sousa, C.P., Nery, F., Azevedo, J.T., Viegas, C.A., Gomes, M.E., & Dias, I.R. (2011). Tartrate-resistant acid phosphatase as a biomarker of bone turnover in dog. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, 1, 40-45.

Sousa, C.P., Azevedo, J.T., Silva, A.M., Viegas, C.A., Reis, R.L., Gomes, M.E. & Dias, I.R. (2014). Serum total and bone alkaline phosphatase levels and their correlation with serum minerals over the lifespan of sheep. *Acta Veterinaria Hungarica*, 62(2), 205-214.

Stabio, M.A.G., Martínez, E.M.C., & Álvarez, M.M.R. (2013). Alternativas al tratamiento de la osteoporosis después del bisfosfonato. *Terapéutica en APS*, 20, 410.

Sujic, R., Beaton, D.E., & Bogoch, E.R. (2016). Patient acceptance of osteoporosis treatment: Application of the stages of change model. *Maturitas*, 88, 70-75.

Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R.W., & Campbel, T.W. (2015). Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. *Roca* (2^aed, pp.349-360).

- Tollemar, V., Collier, Z.J., Mohammed, M.K., Lee, M.J., & Ameer G.A. (2015). Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes & Diseases*, 3, 56-71.
- Travlos, G.S. (2012). Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, 34, 548-565.
- Urgell, C.V., Mesquida, M.M., Fernandez, R.V. & Vicente, J.A.G. (2017). Adecuación del tratamiento de la osteoporosis en prevención primaria. Estudio cuantitativo y cualitativo. *Atención Primaria*.
- Verbruggen, S. W., Garrigle, M. J., Haugh, M. G., & Voisin, M.C. (2015). Altered Mechanical Environment of Bone Cells in an Animal Model of Short- and Long-Term Osteoporosis. *Biophysical Journal*, 108, 1587-1598.
- Weiss, D.J., & Wardrop, K.J. (2010). Veterinary Hematology. *Wiley-Blackwell* (6ªed, cap. 4, pp. 43-267).
- Wu, Z., Lei, W., Hu, Y., Wang, H., Wan, S., Ma, Z., Sang, H., *et al.* (2008). Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Medical Engineering & Physics*, 30, 1112-1118.
- Yu, V.W.C., & Scadden, D.T. (2016). Current Topics in Developmental Biology. *Elsevier* (cap. 2, pp. 23-32).
- Zarrinkalam, M.R., Beard, H., Schultz, C.G., & Moore, R.J. (2009). Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. *Euro Spine Journal*, 18, 244-253.
- Zhang, Z., Ren, H., Shen, G., Qiu, T., Liang, D., Yang, Z., Yao, Z., *et al.* (2016). Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 438-446.

ANEXOS

Tabela 1. Parâmetros hematológicos normais no ovino

Fonte: Weiss & Wardrop, 2010; Dias *et al.*, 2010.

Parâmetros hematológicos normais no ovino	
Eritograma	Valores de referência
Eritrócitos totais (RBC) ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9-15
Hemoglobina (g/dl)	9-15
Hematócrito (%)	27-45
VCM (fL)	28-40
HCM (pg)	8-12
CHCM (%)	31-34
RDW (μm)	3.2-6.0
Leucograma	
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.0-8.0
Neutrófilos (banda)	Raros
Neutrófilos (segmentados) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.7-6.0
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2.0-9.0
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0-0.75
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0-1.0
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0-0.3

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos clínicos normais no ovino

Fonte: Peter Jackson, 2002

Parâmetros bioquímicos clínicos normais no ovino	
Metabolitos	Valores de referência
Glucose (mg/dL)	50-80
Colesterol (mg/dL)	43-103
Função Renal	
Ureia (mg/dL)	10-35
Creatinina (mg/dL)	1.2-1.9
Enzimas	
Aspartato aminotransferase (AST) (U/L)	60-280
Alanina aminotransferase (ALT) (U/L)	22-38
γ - Glutamil transferase (GGT) (U/L)	20-52
Fosfatase Alcalina (U/L)	68-387
Minerais	
Cálcio Total (mmol/L)	2.88-3.20
Fósforo	1.62-2.36
Magnésio	0.90-1.26
Proteínas	
Proteínas Totais (g/dL)	6-7.9
Albumina (g/dL)	2.4-3
Electrólitos	
Sódio (mmol/L)	145-152
Potássio (mmol/L)	3.9-5.4
Cloretos (mmol/L)	95-103
Marcadores de Reabsorção Óssea	
TRAP (U/L)	0,14-5,9

Autorização da Direção Geral de Alimentação e Veterinária para a realização do estudo experimental



DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

Direcção de Serviços de Saúde e Protecção Animal

2009-04-13 010379

Ex^{ma} Senhora
Professora Maria Isabel Ribeiro Dias
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
Departamento de Ciências Veterinárias
Quinta de Prados
Apartado 1013
5001 - 801 VILA REAL

Sua referência

Sua comunicação de

Nossa referência
0420/000/000
/2009

Assunto: **PROTECÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA FINS EXPERIMENTAIS E/OU OUTROS FINS CIENTÍFICOS - PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJECTO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Na sequência do pedido efectuado por V. Ex^a no sentido de poder ser autorizada a realização do projecto experimental designado "**Study of biomarkers of bone metabolism for assessment of the pathophysiology of normal and disturbed fracture healing process in sheep as a model for orthopaedic research**", cabe-me informar que o mesmo foi levado à consideração dos membros da Comissão Consultiva prevista na alínea b) do n.º 49, da Portaria n.º 1005/92, de 23 de Outubro, sendo que os mesmos não levantaram qualquer objecção à solicitação supra referida.

Mais se informa V. Ex^a que esta Direcção Geral também nada tem a opor ao projecto apresentado, pelo que, poderá o mesmo ser levado a efeito.

Com os melhores cumprimentos,

O Director-Geral

As) Carlos Agrela Pinheiro

Albertina Vasconcelos
Chefe da Divisão
Bem-Estar Animal

APM/

PRADO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 - 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX. 21 323 95 65