



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA E SAÚDE**



**LUIS SCHIPER**

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DA VIABILIDADE DE IMPLANTE  
ÓSSEO EM UM NOVO MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE POR  
MEIO DE RADIOMARCADORES**

**TESE DE DOUTORADO**

**Salvador  
2017**

**LUIS SCHIPER**

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DA VIABILIDADE DE IMPLANTE  
ÓSSEO EM UM NOVO MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE POR  
MEIO DE RADIOMARCADORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Saúde.

Orientador: Roberto José da Silva Badaró

Co-orientadora: Bluma Linkowski Faintuch

Salvador  
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

SC336 Schiper, Luis  
Investigação funcional da viabilidade de implante ósseo em um novo modelo animal de osteonecrose por meio de radiomarcadores / Luis Schiper. -- Salvador, 2017.  
85 f. : il

Orientador: Roberto José da Silva Badaró.  
Coorientadora: Bluma Linkowski Faintuch.  
Tese (Doutorado - Medicina e Saúde) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2017.

1. Necrose óssea. 2. Angiogênese. 3. Enxerto ósseo. 4. Radiotraçadores sistêmicos. 5. Fêmur. I. Silva Badaró, Roberto José da. II. Linkowski Faintuch, Bluma. III. Título.

**LUIS SCHIPER**

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DA VIABILIDADE DE IMPLANTE  
ÓSSEO EM UM NOVO MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE POR  
MEIO DE RADIOMARCADORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Saúde.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Roberto José da Silva Badaró (Professor Orientador)  
Professor Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

---

Bluma Linkowski Faintuch (Professora Co-orientadora)  
Professora Doutora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade São Paulo

---

Gildásio de Cerqueira Daltro  
Professor Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

---

Vilson Ulian  
Professor Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

---

César Augusto de Araújo Neto  
Professor Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

---

Luiz Antônio de Alcântara de Oliveira  
Professor Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Feira de Santana

---

Sóstenes Mistro  
Professor Doutor do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal da Bahia

*À minha esposa Patrícia e às minhas filhas  
Sacha e Dvoira por serem a razão da minha  
existência, a alavanca do meu entusiasmo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Roberto José da Silva Badaró, cujos passos eu sigo desde meus tempos de estudante de Medicina e devo este voto de confiança e sensibilidade no caminhar deste trabalho

À minha co-orientadora Prof. Bluma Linkowski Faintuch, por todo incentivo, carinho, segurança e rigor, cobrando a perfeição esperada de um doutorando, com seu exemplo de doação e organização no acompanhamento deste trabalho. Seu apoio e suas orientações permitiram construir esse sonho.

Ao Prof. Joel Faintuch, um verdadeiro pai e amigo, grande incentivador dessa e outras caminhadas, sempre presente nos momentos mais difíceis e importantes da minha vida.

Elisângela Chinen e Érica Aparecida de Oliveira, pela valiosa ajuda na etapa experimental do nosso estudo.

Ao Centro de Radiofarmácia, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP, pela disponibilidade da infraestrutura para o desenvolvimento experimental.

À Faculdade de Odontologia da USP pela análise histológica, na pessoa do Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves

“Um sonho grande dá o mesmo trabalho do que ter um sonho pequeno”

Jorge Paulo Lemann

## RESUMO

**Objetivo:** Um segmento ósseo com necrose não é uma novidade em Ortopedia, no entanto, métodos de imagem convencionais podem perder o diagnóstico precoce, ou a extensão da doença. Com o objetivo de desenvolver um novo modelo animal para estudar a osteonecrose, foi realizada a implantação de um fêmur desvascularizado em uma bolsa abdominal subcutânea de camundongo, utilizando radioisótopos no diagnóstico e monitoração, a longo prazo, deste transtorno. A fim de manter a mobilidade e a longevidade dos animais, o fêmur foi colhido a partir de doadores singênicos, o que também elimina a rejeição e mantém um padrão de isquemia pura, sem resposta imunológica. Foram selecionados dois radiotraçadores de Tecnécio-99m, dirigidos à angiogênese e matriz óssea respectivamente. **Métodos:** O ácido medrônico e um peptídeo homodímero conjugado com RGDfK, foram radiomarcados com Tecnécio-99m. A biodistribuição e demais procedimentos foram avaliados em camundongos Swiss. Os fêmures enxertados e de controle foram avaliados depois de 15, 30 e 60 dias, incluindo a cintilografia, a tomografia computadorizada e a análise histológica. **Resultados:** A pureza radioquímica dos radiomarcadores foi superior a 95%. A biodistribuição demonstrou uma boa depuração sanguínea após 1 hora da administração dos radiotraçadores. Para o  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>, observou-se uma excreção renal acentuada, comparada ao  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP. Porém, este último, como esperado, mostrou alta captação óssea. Os resultados das captações no fêmur controle (não isquêmico) foram iguais em todos os tempos avaliados. No fêmur implantado o  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> teve a absorção mais elevada após 15 dias da enxertia, de acordo com a angiogênese precoce esperada nas circunstâncias. No que diz respeito ao  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP no implante, absorções semelhantes foram documentadas em todos os momentos, em consonância com viabilidade óssea sustentada, mas elas foram menores do que no fêmur controle, como foi confirmado pela histologia. **Conclusões:** O diagnóstico de viabilidade do enxerto por radiomarcadores sistêmicos é um método sensível para demonstração precoce de isquemia e necrose óssea, além de poder monitorizar a angiogênese utilizando-se o radiomarcador isotópico.  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> Também a vitalidade global do enxerto pôde ser demonstrada com auxílio do marcador ácido medrônico; esta técnica pode constituir-se em alternativas de diagnóstica, devido sua praticidade e conveniência, com potenciais aplicações clínicas.

**Palavras-chave:** Necrose óssea, Angiogênese, Enxerto ósseo, Radiotraçadores sistêmicos, Fêmur. Bolsa abdominal, Tecnécio-99m, Modelo experimental

## ABSTRACT

**Objectives:** A bone segment with osteonecrosis is not a novelty in Orthopedics, however conventional imaging methods may miss early diagnosis or the extent of the disorder. Aiming to develop a new animal model to study Osteonecrosis, an implantation of an isolated femur in a subcutaneous abdominal pocket was performed, using radioisotopes to diagnose and monitor the long term of this disorder. To maintain the mobility and longevity of the animals, the femur was harvested from syngeneic donors, which also eliminates rejection and maintains a pattern of pure ischemia with no immune response. Two radiotracers of Technique-99m were selected, directed to angiogenesis and bone matrix, respectively. **Methods:** The medronic acid, and a homodimer peptide conjugated with RGDfK, were radiolabeled with technetium-99m. Biodistribution along with other procedures were evaluated in Swiss mice. The grafted and control femurs were evaluated after 15, 30 and 60 days, including scintigraphy, CT and histological analysis. **Results:** Radiolabeling achieved high radiochemical purity, above 95%. The biodistribution confirmed good blood clearance after 1 hour of administration. For  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> remarkable renal excretion was observed, compared to  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP, but the latter one, as expected, revealed higher bone uptake. The results obtained in the control (nonischemic) femur were equal at all times points. In the implanted femur,  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> uptake was highest after 15 days, consistent with early angiogenesis expected in the circumstances. As concerns  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP in the implant, similar uptake was documented at all times points, consistent with sustained bone viability; however, it was lower than that detected in the control femur, as confirmed by histology. **Conclusions:** The diagnosis of graft viability by systemic radiotracers is a sensitive method for the early demonstration of ischemia and bone necrosis, in addition to being able to monitor angiogenesis using the  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> topic radiolabel. Also, the overall vitality of the graft could be demonstrated with the aid of the medronic acid marker; this technique may constitute diagnostic alternatives, due to its practicality and convenience, with potential clinical applications.

**Keywords:** Osteonecrosis, Angiogenesis, Bone graft, Radiotracers, Femur, Abdominal pocket, Technetium-99m, Experimental model

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelos animais experimentais de osteonecrose .....	44
Figura 2 - Estrutura de conjugado $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)] <sub>2</sub> (A) e do ácido difosfônico de metileno (MDP) (B).....	47
Figura 3 - Radiocromatograma: (A) $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)] <sub>2</sub> ; (B) $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ , (C) $^{99m}\text{Tc}$ -tricina.....	54
Figura 4 - Imagem Tomográfica de animal imediatamente implantado com fêmur singênico (imagem superior) e após 60 dias de armazenamento (imagem inferior).....	55
Figura 5 - Fêmur singênico após 15 dias de implante na bolsa abdominal. ....	56
Figura 6 - Fotografias do fêmur controle (imagem superior) e fêmur enxertado (imagem inferior) em momentos diferentes. A: 15 dias, B: 30 dias, C: 60 dias.....	57
Figura 7 - Peso médio de ambos os fêmures – controle e enxertado – dos camundongos após o armazenamento subcutâneo com 15, 30 e 60 dias (intervalo de confiança).....	57
Figura 8 - Captação média de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)] <sub>2</sub> em ambos os fêmures – controle e enxertado – dos camundongos após o armazenamento subcutâneo com 15, 30 e 60 dias em porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g) com intervalo de confiança.....	58
Figura 9 - Captação média de $^{99m}\text{Tc}$ -MDP em ambos os fêmures – controle e enxertado – dos camundongos após o armazenamento subcutâneo com 15, 30 e 60 dias em porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g) com intervalo de confiança....	58
Figura 10 - Imagem cintilográfica de camundongos, demonstrando o enxerto de fêmur após 15 dias de armazenamento abdominal. A: captação do $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)] <sub>2</sub> (ROI = 0,5%) e B: captação do $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (ROI = 0,1%). ....	59
Figura 11 - Corte histológico (H & E, 100 X): trabéculas de osso (seta vertical) e medula óssea (seta horizontal).....	60
Figura 12 - Corte histológico de fêmur enxertado após 15 dias (H & E, 100 X). Medula óssea delgada e com focos de necrose (seta horizontal); Áreas de edema (seta vertical). ....	61
Figura 13 - Corte histológico do fêmur enxertado após 30 dias (H & E, 100 X). Trabéculas ósseas desorganizadas (seta). ....	62
Figura 14 - Corte histológico fêmur enxertado, 60 dias (H & E, 100 X). Destruição óssea (seta para baixo) e medular (dupla seta para cima).....	63

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Biodistribuição de radiotraçadores em camundongos Swiss sadios (% DI/g). (Dose injetada) .....	55
--	----

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Estadiamento de FICAT e ARLET .....	25
Quadro 2 – Estadiamento de STEINBERG.....	25
Quadro 3 - Estadiamento de MARCUS .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Teste "t"	Teste de Student
% DI/g	Porcentagem de dose injetada por grama
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micro molar
$^{99}\text{Mo}$	Molibdênio 99 m
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio 99m
$^{99\text{m}}\text{TcO}^{4-}$	Pertecnetato
BMP	Proteína óssea morfogenética
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNEM	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO	Cintilografia óssea
DEXA	Dual Energy x-ray absorptiometria
DMO	Densidade mineral óssea
EDDA	Ethilenediamina
H & E, 100 X	Fotomicrografia com coloração hematoxilina eosina
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
HYNIC	Ácido Hidrazinonicotinamida
IgG	Imunoglobulina G
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITLC-SG	Fitas cromatográficas de camadas de sílica gel
kDa	Unidade de massa atômica ou Dalton
keV	Mil elétrons-volt (unidade de medida de energia)
M	Molar
MBq	Megabecquerel (atividade de uma quantidade de material radioativo)
mCi	MiliCurie (unidade de medida de radioatividade)
MDP	Ácido medrônico (difosfato de metileno)
mg	Miligrama
ml	Mililitro
ml/kg	Mililitro por quilograma
ml/min	Mililitro por minuto

mM	Milimolar
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Molibdato
Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub>	Pertecnetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
°C	Graus centígrados
ON	Osteonecrose
<i>p</i> <0,05	Nível de significância menor que 0,05
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogênico
pmol/L	Picomole/litro
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
RGD	Sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico
RGDfK	Homodímero cíclico arginina-glicina-ácido aspártico com ácido glutâmico
RNM	Ressonância nuclear magnética
ROI	Regiões de interesse
SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloreto estanoso
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
T ½	Tempo de meia vida
TC	Tomografia computadorizada
TFA	Ácido trifluoroacético
α	Alfa
β	Beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	17
2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 OSSO NORMAL.....	18
<b>3.1.1 Anatomia .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Suprimento sanguíneo.....</b>	<b>19</b>
3.2 OSTEONECROSE.....	21
3.3 ENXERTO ÓSSEO.....	34
<b>3.3.1 Conceito e história .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.3 Tipificação .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.4 Aspecto histológico .....</b>	<b>38</b>
3.4 ANGIOGÊNESE – INTEGRINA – PEPTÍDEOS COM SEQUÊNCIA ARGININA – GLICINA – ÁCIDO ASPÁRTICO (RGD).....	41
3.5 INTERESSES EM MODELOS EXPERIMENTAIS.....	43
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>45</b>
4.1 MATERIAIS .....	45
<b>4.1.1 Equipamentos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2 Reagentes e solventes.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.3 Outros .....</b>	<b>47</b>
4.2 MÉTODOS.....	47
<b>4.2.1 Marcação do MDP com <sup>99m</sup>Tc .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2 Marcação de HYNIC-E-c(RGD)<sub>2</sub> com <sup>99m</sup>Tc, usando EDDA/tricina como coligantes .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.3 Controle radioquímico .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.4 Estudos biológicos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.5 Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose (ON) é um fenômeno frequente na prática ortopédica e se baseia na interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada área anatômica de qualquer osso, envolvendo eventos de reabsorção, revascularização e regeneração, com ou sem a preservação do aspecto morfológico.

Tem como fatores etiopatogênicos o trauma; o alcoolismo; o uso de corticosteroides; hemoglobinopatias, incluindo a anemia falciforme; lúpus eritematoso; doença de Legg-Perthes; exposição à radiação ou agentes citotóxicos; doença de Gaucher; disbarismo; SIDA; hiperlipidemia; pancreatite e gota. Existem ainda casos não identificados etiologicamente, chamados de idiopáticos. Mais recentemente, ênfase tem sido dada ao estudo da predisposição genética para a ON.

O sítio mais frequentemente observado na rotina do ortopedista tem sido o do cabeça femoral.

Evoluindo desde micro fraturas não reconhecidas e pequenos focos de necrose ao colapso do osso e perda total da função, a patologia pode apresentar um espectro bastante variável de cursos clínicos.

Atualmente, nos EUA, ocorrem cerca de 10 a 20 mil novos casos por ano, afetando a população em sua fase mais produtiva.

O diagnóstico da ON pode ser feito por meio de exames laboratoriais, mas é na imagiologia, em especial, na Medicina Nuclear que encontra mais êxito.

A cintilografia óssea (CO), utilizando conjugados radiomarcados com tecnécio, tem sido o exame complementar mais preciso, sensível e de melhor custo-benefício, abrindo uma nova fronteira no âmbito do diagnóstico da ON.

Os tratamentos preconizados dependem da evolução do quadro clínico do paciente, variando da observação até a realização de cirurgias complexas.

Até a segunda metade do século passado, pouco se sabia sobre essa patologia, mas os conhecimentos acerca dela vêm aumentando, principalmente pelo crescimento dos casos anuais diagnosticados.

Estudos também têm sido realizados em modelos animais experimentais, buscando compreender a patogênese envolvida nessa desordem, bem como aprimorar as medidas terapêuticas.

Existem diversos protocolos experimentais empregados no estudo da ON e as opções incluem a indução da isquemia óssea por trauma, farmacológica ou uma combinação das duas.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um modelo animal de ON passível de monitorização por distintos métodos diagnósticos (tomográfico, histológico e de Medicina Nuclear) e explorar o uso de radiofármacos no diagnóstico precoce e evolutivo da ON.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Desenvolver um modelo animal de ON simples, confiável, de longa duração e baixo custo, passível de monitorização por distintos métodos diagnósticos, a saber tomográfico, histológico e de Medicina Nuclear.

### **2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO**

Explorar a funcionalidade de radiofármacos nos diagnósticos precoce e evolutivo da isquemia e necrose óssea experimental por meio da Medicina Nuclear.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 OSSO NORMAL

#### 3.1.1 Anatomia

O osso humano é um tecido conjuntivo especializado que surge na sétima semana da embriogênese. Trata-se de uma estrutura colágena mineralizada que, em conjunto com tendões, ligamentos e cartilagens, forma o sistema esquelético e tem as funções de dar a forma, sustentar e proteger o corpo (KINI & NANDEESH, 2012).

O esqueleto humano apresenta 206 (duzentos e seis) ossos classificados em três tipos – longos, planos e pequenos – distribuídos na cabeça, pescoço, ouvido, tórax, abdômen, membros inferiores e superiores. Quase todos eles exibem, macroscopicamente, uma estrutura externa, maciça, denominada cortical (córtex), constituída por osso compacto, que confere resistência; e outra interna, trabecular, denominada medular, constituída de osso esponjoso que é ocupado pela medula óssea, tecido com função hematopoiética (BAPTISTA *et. al.*, 2003).

O tecido ósseo é composto por células e pela substância intercelular – matriz, sais inorgânicos e água (KINI & NANDEESH, 2012).

O perióstio, membrana que recobre a cortical dos ossos, apresenta uma camada delgada e fibrosa, contendo tecido conjuntivo denso e fibroblastos seguida por outra composta por células osteogênicas fusiformes pluripotentes (NOBESCHI, 2010).

Essas células, também denominadas osteoprogenitoras, proliferam e dão origem aos numerosos osteoblastos que revestem a superfície óssea em crescimento aposicional ativo (NOBESCHI, 2010).

Os osteoblastos sintetizam e secretam a fração orgânica da substância intercelular, ocupam lacunas dessa substância e se transformam em osteócitos, acrescentando osso novo à superfície (NOBESCHI, 2010).

Outro tipo celular encontrado no tecido ósseo é o osteoclasto, que consiste numa célula gigante multinucleada, formada supostamente pela fusão de diversos osteoblastos ou de células do estroma medular, funcionando tanto para reabsorver minerais como substância orgânica intercelular (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

A nutrição do osso esponjoso é realizada por canalículos – finos canais formados pelos prolongamentos citoplasmáticos de osteócitos e líquido tissular – que perfuram o osso e, por difusão, trazem os nutrientes dos canais de Volkmann (canais microscópicos presentes na cortical óssea) para os osteócitos e retiram os metabólitos celulares (REBOCHO *et. al.*, 2009).

No osso compacto, a nutrição é realizada por meio do sistema harversiano – unidade anatômica e funcional básica – constituído por um canal de Havers envolvido por um grupamento de lâminas e lacunas, contendo osteócitos e osteoblastos, que se comunicam por meio dos canais de Volkmann à superfície e à cavidade medular do osso (REBOCHO *et. al.*, 2009).

Na substância intercelular, a matriz corresponde à fração orgânica e é composta principalmente por colágeno tipo I (90%); os cristais de hidroxiapatita são os principais sais inorgânicos e a água ocupa os espaços dentro dos ossos, incluindo os canalículos (KINI & NANDEESH, 2012).

A integração dos componentes minerais com a matriz orgânica fornece ao osso suas características de dureza e elasticidade (KINI & NANDEESH, 2012).

O tecido ósseo não apresenta vasos linfáticos, apenas o perióstio tem drenagem linfática (LOPEZ-CURTO; BASSINGTHWAIGHTE; KELLY, 1980).

### **3.1.2 Suprimento sanguíneo**

- **Ossos longos**

Os ossos longos têm três fontes de suprimento sanguíneo: vasos das extremidades do osso (epifisário e metafisário), duas ou três artérias nutrientes que penetram na diáfise e os vasos periostais (LOPEZ-CURTO; BASSINGTHWAIGHTE; KELLY, 1980).

Depois que a artéria nutriente penetra na diáfise, ela se ramifica em ascendente principal e descendente, nutrindo diretamente a cortical, os sinusoides intramedulares e, indiretamente, por meio de anastomoses com os vasos epifisários e metafisários, as extremidades do osso. Os vasos terminais dos ramos ascendentes e descendentes principais são responsáveis pelo suprimento sanguíneo nas extremidades do osso longo, onde se unem com vasos epifisários e metafisários (LAING, 1956).

As arteríolas corticais que se originam da artéria nutriente medular principal caminham em direção radial, penetrando no córtex de forma isolada ou em feixes de duas a seis arteríolas. Dentro do córtex, elas dão origem a ramos, alguns estendendo-se

longitudinalmente ao eixo do osso, enquanto os outros prosseguem no sentido radial, formando os capilares dentro dos sistemas haversianos (TRUETA & CALADIAS,1964).

Os canais haversianos contêm geralmente dois vasos de calibres diferentes, sugerindo que um transporta o sangue arterial e o outro corresponde à veia. A artéria nutriente e seus ramos medulares ascendentes são fontes de suprimento sanguíneo para, pelo menos, dois terços internos do córtex. Aproximadamente 30% do fluxo sanguíneo se dirige para os leitos capilares da medula e 70% suprem os leitos capilares corticais. Os leitos capilares da medula e corticais são independentes entre si e o fluxo sanguíneo de cada um drena de forma separada (LAING,1953).

A direção e extensão do fluxo sanguíneo do córtex diafisário parece ser centrífugo, com o sangue penetrando na face endosteal do sistema de nutriente medular e saindo através da superfície perióstica (RHINELANDER, 1968).

Nos casos em que os sistemas nutrientes medular e periostal são interrompidos, ocorre um aumento de fluxo sanguíneo metafisário. Se a circulação através das artérias nutrientes e vasos metafisários é interrompida, ocorre a proliferação de vasos periósticos e o fluxo sanguíneo periostal fica aumentado, sendo observado a formação perióstica de um osso novo (JOHNSON, 1927).

Quando o fluxo sanguíneo é descontinuado através da artéria nutriente, cerca de dois terços do córtex se torna isquêmico e necrótico, mas o terço externo permanece viável. Os vasos periósticos se originam principalmente nos músculos circundantes e fornecem um suprimento sanguíneo para o terço externo da metade do córtex. Quando o suprimento sanguíneo nutriente medular é interrompido e o perióstio é destacado do osso, toda a espessura do córtex torna-se necrótica (MACNAB,1958).

- **Fêmur**

O fêmur é um osso longo que apresenta suprimento vascular de sua cabeça proveniente de um anel arterial extracapsular na base do colo, que é formado posteriormente por um ramo da artéria circunflexa femoral medial e anteriormente por ramos da artéria circunflexa femoral lateral. Desse anel, ramos ascendentes se dirigem ao longo do colo femoral sob o revestimento sinovial e fibroso do colo até a cabeça, onde formarão um anel subsinovial intracapsular. No seu caminho ao longo do colo, esses vasos ascendem e irrigam a região metafisária e depois penetram na cabeça femoral junto à margem da cartilagem articular, sendo o grupo lateral a fonte sanguínea mais importante (MACEDO; GALIA, 2003).

Na parte diafisária, o fêmur tem sua circulação sanguínea com os mesmos sistemas arteriais e venosos de um osso longo do esqueleto, ficando a região epifisária proximal com característica específica, que propicia determinadas situações patológicas tanto pós-traumáticas quanto isquêmicas de ordem sistêmica (MACNAB, 1958).

### 3.2 OSTEONECROSE

- **Conceito, história e patogênese**

A Osteonecrose (ON), também conhecida por necrose avascular ou necrose isquêmica, é uma desordem inespecífica comumente observada na Ortopedia, que acomete qualquer segmento ósseo, podendo evoluir assintomaticamente ou, na sua forma mais exuberante, acarretar um completo colapso da arquitetura do osso, secundária à morte de seus elementos vivos – os osteócitos e demais células (FONDI & FRANCHI, 2007).

Historicamente, a expressão “necrose óssea” remonta ao mundo helênico, figurando no compêndio Sobre Fraturas escrito por Hipócrates. Porém, o termo “necrose” só foi incorporado à língua inglesa em 1665 (McCARTHY, 1982).

Não existe consenso acerca de quem é o mérito pela primeira descrição da ON. A literatura científica faz referência aos escritos de Alexander Munro, em 1738, e aos de James Russell, em 1794, reputando ao segundo a descrição anatomopatológica mais detalhada (STEINBERG & STEINBERG, 2014).

Em outro trabalho, há a referência de que o crédito pela primeira descrição da ON foi devido a Franz König, cirurgião alemão, em 1888 (MULLIKEN, 1993).

Desacordos à parte, se considerarmos o ano de 1738 apenas como uma referência, podemos constatar que a ON é tema recorrente na literatura médica há quase 300 (trezentos) anos.

As décadas de 1930 e 1940 foram extremamente profícuas no que tange a produção e sistematização de conhecimentos científicos acerca da ON, haja vista os trabalhos publicados por dois pesquisadores, Dallas Pheemister e Chandler. Ambos se dedicaram a correlacionar achados clínicos, alterações radiológicas e patologia presentes em pacientes que desenvolveram necrose óssea após trauma em cabeça de fêmur, apontando o comprometimento da circulação sanguínea subsequente ao trauma – a interrupção do suprimento sanguíneo, o infarto ósseo isquêmico – como elemento preponderante na gênese da necrose óssea. (PHEMISTER, 1934; PHEMISTER, 1940; CHANDLER, 1948; MULLIKEN, 1993).

Investigações posteriores acerca da patogênese da ON secundária a eventos de origem mecânica (trauma e disbarismo), física (necrose por radiação ionizante) e química (necrose citotóxica por quimioterapia) evidenciaram comprometimento da perfusão sanguínea do osso e lesão direta de osteócitos, reforçando a hipótese isquêmica de Pheemister e Chandler. No entanto, nos demais casos em que a necrose óssea surge na ausência desses eventos, a isquemia óssea também se faz presente, mas, a despeito dos avanços e descobertas científicas dos últimos 50 (cinquenta) anos, não se obteve consenso sobre sua gênese (SHARAREH & SCHWARZKOPF, 2015; PROSNITZ *et. al.*, 1981; SHIM, MACKENZIE & WINQUIST, 2008; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

Atualmente, os pesquisadores concordam que a coagulação intravascular de áreas circunscritas do osso desempenha papel capital tanto nas ON traumáticas quanto nas não-traumáticas e, no que concerne a essas últimas, aceitam que pelo menos um desses três mecanismos estão envolvidos em sua gênese: no primeiro, a coagulação intravascular é, via de regra, secundária à isquemia; no segundo, resulta de mecanismos intravasculares e medulares do osso; e no terceiro, tem origem multifatorial, condicionada pela concomitância e sinergia de predisposição genética e fatores de risco não-genéticos (JONES Jr, 1994; SEAMON *et. al.*, 2012).

- **Epidemiologia, classificação e etiologia**

Dados demográficos acerca das ON são escassos no Brasil e no mundo.

Apenas a Holanda e o Reino Unido, por serem territorialmente pequenos e terem um serviço de saúde pública centralizado, fazem registros sistemáticos em bancos de dados

nacionais – o PRISMANT (Dutch Research Databank) da Holanda e os GPRD (General Practice Research Database) e THIN (The Health Improvement Network) do Reino Unido. Mesmo assim, artigos publicados nesses países, obtidos por meio de busca ativa na Internet, trazem dados epidemiológicos de 1989 a 2004, ratificando a escassez de informações atualizadas sobre a necrose óssea (GOSLING-GARDENIERS, RIJNEN & GARDENIERS, 2014; COOPER *et. al.*, 2010).

Os Estados Unidos reportam cerca de 20.000 casos novos de ON de quadril por ano, com uma estimativa acumulada entre 0,3 a 0,6 milhões de pessoas acometidas, mas estes números refletem apenas os pacientes tratados com artroplastia de quadril, não a totalidade de pacientes com ON desse sítio ósseo específico ou de outros locais (GOOSLING-GARDENIERS, RIJNEN & GARDENIERS, 2014).

Na Ásia, a ON é uma desordem que vem crescendo na população e tem se tornado um problema sério de saúde pública. O Japão refere uma frequência de 2:10.000 indivíduos, levando a uma estimativa de 24.000 casos novos por ano e na China este número já é cerca de 75.000 (GOSLING-GARDENIERS, RIJNEN & GARDENIERS, 2014).

Grandes têm sido os entraves para proceder à coleta e ao registro de dados epidemiológicos acurados sobre a ON e isso se deve à complexidade da própria desordem, à dificuldade de diagnosticar os estágios precoces, à presença de inúmeros fatores etiológicos, dentre outras de ordem técnica (GOSLING-GARDENIERS, RIJNEN & GARDENIERS, 2014).

Quanto à incidência de ON em relação à idade, sexo e raça, relata-se que, geralmente, ela acomete a população jovem na faixa etária de 20 a 40 anos, sendo mais evidenciada em homens dos 18 aos 59 anos, numa proporção de 8:1. A partir dos 50 anos em diante, a incidência é maior entre as mulheres, numa proporção de 3:1. E não existem dados epidemiológicos relativos à raça (COOPER *et. al.*, 2010; STEINBERG & STEINBERG, 2014; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

As ON podem ser divididas em traumáticas ou não-traumáticas, em função dos eventos que lhes dão origem, e idiopáticas (20-40%) (MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

As condições traumáticas – fraturas e/ou luxações – figuram entre os principais fatores etiológicos. Dentre as traumáticas, 60-75% das fraturas da colo do fêmur evoluem para ON e são, inequivocamente, as mais frequentes, seguidas pelas de escafoide (15-40% das fraturas desse sítio) e de talos. Nestes três sítios, a circulação sanguínea se dá prioritariamente pela porção

central do osso, e o trauma acaba por lesar os vasos, interrompendo o suprimento sanguíneo e levando à morte desses ossos (JACOBS,1978; SEAMON *et. al.*, 2012).

O alcoolismo (20-40%); a corticoterapia (35-40%); o lúpus eritematoso; as hemoglobinopatias, incluindo a anemia falciforme; a doença de Legg-Perthes; a exposição à radiação ou agentes citotóxicos; a doença de Gaucher; o disbarismo; SIDA; hiperlipidemias; estados de hipercoagulabilidade sanguínea; cânceres; gravidez; pancreatite e gota têm sido identificados como fatores etiológicos das ON de origem não traumáticas, sendo os dois primeiros os mais frequentes e a cabeça femoral também tem sido referida com sítio de eleição (ARO & AHO,1993; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

Pacientes com história de necrose avascular de cabeça de fêmur de origem não traumática e idiopática devem ser avaliados quanto à bilateralidade do evento, pois essa ocorrência tem sido reportada em mais de 70% dos casos (BOETTCHER *et. al.*, 1970).

- **Quadro clínico e estadiamento**

Nos estágios iniciais da ON, a maioria dos pacientes apresenta quadro clínico assintomático. À medida que a necrose avança, com o colapso do arcabouço ósseo, a dor passa a ser a queixa mais frequentemente relatada, precedendo as alterações radiológicas em semanas e até meses. Sua intensidade é variável, sendo referida, principalmente, quando o sítio ósseo comprometido é pressionado ou quando da mobilização articular, evoluindo, eventualmente, para dor em repouso (STEINBERG & STEINBERG, 2014; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

Na articulação do quadril, sítio mais afetado, o quadro clínico se caracteriza por dor unilateral referida na virilha, com irradiação para nádega, coxa e/ou região medial do joelho ipsilaterais; redução das atividades cotidianas e perda da qualidade de vida. Ao exame físico, evidencia-se limitação funcional progressiva, claudicação, rigidez articular e dor a rotação interna do membro inferior afetado (ZALAVRAS & LIEBERMAN, 2014).

Para avaliar a evolução da ON de quadril nos pacientes, foram criados três diferentes sistemas de estadiamento baseados nos achados clínicos, radiológicos e RNM – Estadiamento de Ficat e Arlet (Quadro 1), Estadiamento de Steinberg (Quadro 2) e Estadiamento de Marcus (Quadro 3) –, sendo os dois primeiros os mais utilizados (MULLIKEN, 1993; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

**Quadro 1 – Estadiamento de FICAT e ARLET**

Estágio	Clinica	Radiografia	RNM
0+	Assintomático	Negativa	Frequentemente ++
I	Dor	Negativa	Positiva
II	Dor	Cistos escleróticos	Positiva
III	Dor	Colapso	Positiva
IV	Dor	Alterações degenerativas	Positiva

Fonte: Adaptado de Moya-Angeler *et. al.*, 2015.

**Quadro 2 – Estadiamento de STEINBERG**

Estágios	Achados
0	Normal; radiografia, Cintilografia óssea e RNM sem alterações
I	Radiografia normal; Cintilografia óssea anormal e/ou RNM anormal
II	Radiografia anormal (cistos, esclerose óssea sem colapso articular)
III	Colapso subcondral
IV	Achatamento da cabeça femoral sem estreitamento do espaço articular ou envolvimento acetabular
V	Estreitamento articular e/ou envolvimento acetabular
VI	Alterações degenerativas avançadas

Fonte: Adaptado de Moya-Angeler *et. al.*, 2015.

**Quadro 3 - Estadiamento de MARCUS**

Estágios	Clínica	Radiografia
I	Assintomático	Formações císticas
II	Assintomático	Densidade óssea aumentada
III	Dor leve e intermitente	Sinal crescente
IV	Dor com atividade	Depressão
V	Dor com atividade	Achatamento e compressão
VI	Dor em repouso	Artrite degenerativa

Fonte: Adaptado de Moya-Angeler *et. al.*, 2015.

## Ferramentas de diagnóstico e avaliação

A identificação clínica para perdas ósseas não faz distinção entre mudanças da matriz óssea, apoptose celular e necrose de tecido. Os recursos para essa avaliação incluem marcadores bioquímicos de remodelação óssea, a radiologia convencional, a densitometria óssea, a tomografia computadorizada (TC), a ressonância nuclear magnética (RNM), estudo histopatológico e a cintilografia óssea (CO) (ZANETTE *et. al.*, 2003).

A remodelação é um fenômeno que nos acompanha ao longo da vida, sendo fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. Nela, a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados pelas células do tecido ósseo, que incluem os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, sendo que o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea. É essa capacidade de avaliação dinâmica que se deseja em um marcador de remodelação óssea (WEILAND; MOORE; DANIEL,1983; TERZI *et. al.*, 2015).

São reconhecidos como marcadores de formação óssea, a fosfatase alcalina total, a fosfatase alcalina óssea, a osteocalcina, o pró-peptídeo do colágeno tipo I; e como marcadores de reabsorção óssea, o cálcio urinário, a hidroxiprolina urinária, a fosfatase ácida tartarato-resistente e as moléculas interligadoras do colágeno tipo I, o C-telopeptídeo (CTX) e o N-telopeptídeo urinário (NTX). O uso destes marcadores em jovens tem sua utilidade bastante restrita, pois faltam padrões de normalidade. Além disso, as altas taxas de remodelação que ocorrem na infância, puberdade e em adultos jovens ampliam ainda mais as variações fisiológicas detectadas por estes métodos, prejudicando sua interpretação e limitando sua utilidade (DELMAS,1999; LOOKER *et. al.*, 2000; SIMS & MARTIN, 2014).

A radiografia convencional nas primeiras fases da osteonecrose é de aspecto normal ou apresenta-se com sutis alterações, dificultando a identificação do processo. Quando essas imagens se tornarem perceptíveis, várias etapas evolutivas terão se passado, fazendo com que este método perca o seu valor (KATTAPURAM & KATTAPURAM, 2008).

A densitometria óssea é um exame que serve para medir a densidade dos ossos a fim de diagnosticar a osteoporose e avaliar o risco de fraturas. Usa uma tecnologia avançada de Raios-X, conhecida como absorciometria radiológica de dupla energia ou DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry). O DEXA, atualmente, é um método estabelecido para medir a densidade mineral óssea (DMO). É um procedimento rápido e indolor, constituindo-se no padrão ouro

para diagnóstico de osteopenia e osteoporose. Seu resultado retrata o final de todos os fenômenos que ocorrem dentro da remodelação da massa do esqueleto, independente de sua natureza, sendo, portanto, considerado pouco elucidativo para a análise do enxerto ósseo e sua vitalidade (ZANETTE *et. al.*, 2003).

A TC identifica com precisão as alterações anatômicas, como a erosão localizada e a perda de massa óssea, podendo fornecer pistas sobre áreas necrosadas e saudáveis. Uma de suas maiores contribuições diz respeito à caracterização de fraturas e colapsos de estruturas esqueléticas. Do ponto de vista fisiológico, suas imagens são estáticas e incapazes de definir momentos de transição na evolução vascular do enxerto ósseo. Trata-se de exame de uso restrito, especialmente para o emprego seriado a longo prazo, por se tratar de método relativamente custoso além de emitir radiações mutagênicas e teratogênicas ao paciente, quando feito com frequência elevada (LAREDO *et. al.*, 1990).

A RNM é também um exame de alto custo financeiro. É especialmente útil em confirmar a suspeita do diagnóstico de necrose óssea, quando os achados da radiologia convencional são normais ou duvidosos, uma vez que, demonstra anormalidades na intensidade do sinal nuclear. Apesar de ser um método não invasivo de obtenção de imagens multiplanares com alta definição, ainda fica aquém do diagnóstico molecular e celular, e só é encontrada em hospitais e clínicas com maior complexidade de procedimentos investigativos (MUGLIA *et. al.*, 2001).

As análises morfológicas, ou sejam, histológica e histopatológica do tecido ósseo, são consideradas as mais confiáveis e precisas. De acordo com Singla (2014), elas identificam claramente o envolvimento da matriz óssea e de diferentes linhagens celulares, bem como suas mudanças de curso. Conhecer as características biológicas, biomecânicas e histológicas do osso em estudo é de fundamental importância para o manejo adequado da ON .

Como ferramenta para utilização no dia a dia, a histopatologia se ressentida da natureza invasiva, do longo tempo de processamento (descalcificação óssea para fins de corte e coloração), e da necessidade de laboratórios especializados em análises ósseas. Tudo isso encarece e inviabiliza o emprego rotineiro (RENTSCH *et. al.*, 2014).

- **Interesse pela imagem cintilográfica óssea**

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica vinculada à Radiologia, que realiza diagnósticos e terapias por meio da utilização de radiofármacos ou radiotraçadores.

Os radiofármacos usados para a obtenção de diagnósticos apresentam, na sua constituição, radionuclídeos emissores de radiação  $\gamma$  ou emissores de pósitrons ( $\beta^+$ ). O decaimento desses radionuclídeos dá origem a radiação eletromagnética penetrante que consegue atravessar os tecidos e ser detectada externamente por meio de câmaras-gama ou câmaras de cintilação, sendo convertida em imagens (SOPENA NOVALES *et. al.*, 2014).

Um radionuclídeo ligado à uma determinada molécula dá a característica diagnóstica ou terapêutica ao radiofármaco. Conhecendo-se previamente suas características bioquímicas é possível saber que caminho metabólico irá seguir e em quais estruturas irá se fixar e isso orienta a escolha médica (XU *et. al.*, 2013).

Os radiofármacos são compostos sem ação farmacológica e são atraídos para órgãos específicos (ossos, por exemplo), produzindo emissões quando introduzidos no corpo. Considera-se que um radiofármaco é bom, quando apresenta uma farmacocinética conveniente, caracterizada pelo baixo tempo de retenção no sangue, alta captação pelo órgão de interesse ou alta razão de captação órgão/tecido e rápida eliminação do corpo (HERNÁNDEZ FALCÓN; MARRERO RIVERÓN; LEDEA LOZANO; 2012).

As melhores modalidades de imagem molecular utilizadas na Medicina Nuclear se destacam pelo seu dinamismo e fidelidade à fisiologia tendo como exemplo a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e da tomografia por emissão de fóton único (SPECT). Todas as técnicas utilizadas na Medicina Nuclear são designadas de moleculares, pois se baseiam não em regiões anatômicas ou características físicas de tecidos, mas em receptores moleculares definidos, que tendem a lhe conferir elevada especificidade (BENADIBA *et. al.*, 2012).

Os métodos de imagem tradicionais como radiografias simples, TC, e também a RNM possuem valor consagrado no diagnóstico e caracterização das múltiplas afecções ósseas e articulares. Tanto assim, que se tornaram equipamento praticamente indispensável na rotina profissional e, por isso mesmo, disponíveis na maioria das instituições especializadas. Para afecções microscópicas que se processam no âmbito celular, como é o caso da ON e dos fenômenos regenerativos da angiogênese, tais métodos só se aplicam mediante utilização de artifícios ou modificações complexas ou, ainda, eles só permitem o diagnóstico numa etapa mais tardia, quando modificações histológicas extensas já ocorreram. Avultam como alternativa, os métodos de imagiologia molecular que utilizam moléculas marcadas isotopicamente (KASTE *et. al.*, 2015; VON STILLFRIED & WEBER, 2014).

Efetivamente tais radiotraçadores, por suas pequenas dimensões e mimetismo com moléculas naturalmente presentes no meio interno, migram para os espaços celulares e subcelulares, tendendo a refletir mais precocemente o que sucede nesses territórios (SOPENA NOVALES *et. al.*, 2014).

Em 1975, a imagem cintilográfica óssea passou a ser um método útil de diagnóstico (SIGNORE *et. al.*, 2001; WEILAND; MOORE; DANIEL, 1983).

Dentre os radiofármacos habitualmente usados para o rastreamento ósseo estão os difosfonatos orgânicos. Cerca de 50% do produto injetado acumula-se no esqueleto (XU *et. al.*, 2013).

Dos fosfonatos concentrados na fase mineral do osso, cerca de dois terços apresentam afinidade por cristais de hidroxiapatita e um terço, por fosfato de cálcio. Dois fatores principais controlam o acúmulo de fosfatos no osso: o fluxo sanguíneo e a eficiência de extração. Ambos são dependentes da permeabilidade capilar, das condições de pH local (equilíbrio ácido-base) e das taxas de hormônio da paratireoide, dentre outros. Os compostos tendem a acumular-se em áreas de maior metabolismo do osso, por ação da enzima sintetase farnesil difosfonato (TURPIN & LAMBERT, 2001).

O radiotraçador mais utilizado com a finalidade acima tem sido Tecnécio-99m difosfonato de metileno ( $^{99m}\text{Tc-MDP}$ ), também conhecido como ácido medrônico. Outros radiofármacos também são empregados com boa exatidão em casos de osteomielite crônica e artrites infecciosas, ainda que geralmente mais dispendiosos e menos disponíveis que o MDP. (GONZÁLEZ, 2002).

A cintilografia óssea utilizando o ácido medrônico (difosfonato de metileno ou MDP) é clássica para avaliação do osso normal e de lesões ósseas. O marcador se liga ao tecido esquelético por quimiossorção, seguida por permuta de hidroxiapatita na matriz inorgânica do osso. (GONZÁLEZ *et. al.*, 2002)

Padrões de varredura do osso patológico são teoricamente caracterizados por lesões hipercaptantes ou hipocaptantes, únicas ou múltiplas e se acompanham ou não de deformação ou perda da morfologia normal do osso. Na osteonecrose avascular, evidentemente espera-se captação nula ou extremamente baixa, dadas as condições de isquemia ali prevalentes (BLANCO & MÁRTINEZ-LÁZARO, 2006).

Na obtenção de radiomarcadores ou radiofármacos, o radionuclídeo Tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) tem sido um dos mais utilizados na prática clínica. O nome "tecnécio" foi originado do

grego *technetos* e significa "artificial", sendo empregado, primeiramente, por Paneth em 1947, justamente por ser o primeiro elemento radioativo produzido pelo homem (TEODORO, 2014).

O tecnécio, cujo número atômico é 43, foi descoberto em 1925 pelos cientistas Noddack *et. al.*, os quais o chamaram, inicialmente, de *massarium*. Eles se basearam nos espectros e emissão de raios X obtidos com concentrados de vários minerais, como por exemplo, a columbita.

Trata-se de um metal de transição situado no Grupo 7 da Tabela Periódica. Apresenta propriedades tanto ácidas como básicas. Seu ponto de fusão é de 2.200°C e seu ponto de ebulição 4.877°C (TURPIN & LAMBERT, 2001; WEINER & THAKUR, 1995).

Em 1938, Emilio Segrè e Glenn T. Seaborg isolaram pela primeira vez o isótopo metaestável tecnécio-99m, depois de bombardear o molibdênio natural por núcleos de deutério em um ciclotron (SEGRÈ E WU, 1940)

O elemento químico tecnécio não é encontrado na crosta terrestre em abundância, pois o mesmo não é gerado continuamente pela reação ou decomposição de outros elementos presentes no planeta. Pequenas amostras de tecnécio foram encontradas em rochas, provavelmente devido aos raios cósmicos que bombardearam a Terra (BANERJEE *et. al.*, 2001).

Seu ótimo desempenho em Medicina Nuclear pode ser atribuído as suas propriedades nucleares e químicas, as quais consistem na emissão de fóton gama com energia monocromática de 140 keV de energia (89% de abundância), ideal para aquisição de imagens cintilográficas. Seu tempo de meia-vida é de aproximadamente 6 horas, o que significa que 93,7% de sua atividade decai em 24 horas, sendo suficientemente longo para realizar a síntese do radiofármaco e suficientemente pequeno para minimizar a dose de radiação ao paciente (WEINER & THAKUR, 1995).

O uso do  $^{99m}\text{Tc}$  ficou muito facilitado, disponível e viável economicamente para utilização rotineira em 1958, com o desenvolvimento do gerador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  (molibdênio-99/tecnécio-99m) no *Brookhaven National Laboratory* – EUA associado a formulação de kits liofilizados (BANERJEE *et. al.*, 2005; JURISSON & LYNDON, 1999)

Os geradores permitem obter um radionuclídeo de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) curto a partir de um radionuclídeo de  $t_{1/2}$  longo e as propriedades químicas dos dois radionuclídeos têm que ser distintas para que sejam facilmente separados (WEINER & THAKUR, 1995).

A coluna cromatográfica do gerador é baseada em um sistema de alumina com o isótopo  $^{99}\text{Mo}$  como produto de fissão. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é produzido pelo radionuclídeo "pai" ( $^{99}\text{Mo}$ ) com  $t_{1/2}$  de 2,75 dias e é eluído a baixas concentrações, da ordem de 10 pmol/L. A atividade do radionuclídeo "filho" ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) vai aumentando à medida que o radionuclídeo "pai" ( $^{99}\text{Mo}$ ) vai decaindo. O  $^{99}\text{Mo}$ , na forma química de  $\text{MoO}_4^{2-}$ , encontra-se adsorvido numa coluna de alumina e, por eluição com soro fisiológico, é apenas eluído o  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , recolhido sob vácuo, enquanto o molibdato fica retido na coluna (OLIVEIRA *et. al.*, 2012).

Várias técnicas de marcação de biomoléculas com tecnécio foram desenvolvidas na última década. É necessário reduzi-lo a um estado de oxidação inferior ao que é obtido do gerador com o uso de agentes redutores. O uso de ligantes denominados de agentes quelantes bifuncionais, que são moléculas que contêm grupos funcionais capazes de unirem-se ao metal  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  formando um complexo, é bastante utilizado (BARTHOLOMÄ *et. al.*, 2010).

O ácido hidrazinonicotinamida (HYNIC) é um agente quelante bifuncional que tem sido bastante estudado e frequentemente usado para sintetizar bioconjugados para radiomarcação com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , por fornecer uma radiomarcação rápida com alto rendimento (MESZAROS *et. al.*, 2011).

Historicamente, desde que Abrams *et. al.*, (1990 apud Faintuch *et. al.*, 2008) relataram a utilização de núcleos de [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-HYNIC para marcação de imunoglobulinas (IgG), investigações passaram a ser realizadas para radiomarcação de proteínas, pequenas biomoléculas, incluindo peptídeos quimiotáticos, análogos da somatostatina e oligonucleotídeos antisense, interleucina-8 e muitos outros (FU *et. al.*, 2010; KOPECKY *et. al.*, 2004; HNATOWICH *et. al.*, 1995; RENNEN *et. al.*, 2002; DECRISTOFORO & MATHER, 1999).

As radiomarcações em forma de kits têm sua produção em massa e distribuição facilitadas, podendo ser usadas em hospitais e clínicas onde haja um gerador presente (EBENHAN *et. al.*, 2014).

- **Tratamento**

- a) Conservador

O objetivo final do tratamento, quer seja ele conservador ou cirúrgico, é o de evitar a possibilidade de perda da congruência articular em regiões epifisárias ou a perda da arquitetura óssea em outras regiões anatômicas (AMANATULLAH; STRAUSS; DI CESARE, 2011).

Preventivamente, podemos identificar os fatores de risco de cada indivíduo e tentar minimiza-los. O processo é de orientação e conscientização quanto ao uso dos corticoides, álcool, fumo e exposição a condições hiperbáricas. Atenção especial também deve ser dada aos pacientes com predisposição genética, como nos casos das coagulopatias, hemoglobinopatias e tendência a hiperlipidemia (AMANATULLAH; STRAUSS; DI CESARE, 2011)

No tratamento conservador, temos o uso de drogas reabsortivas/anabolizantes – bisfonatos e proteínas morfo genéticas (BMP) –, que ainda estão em fase experimental, não tendo tempo suficiente de pesquisa para afirmar, com segurança, que demonstram capacidade para retardar a reabsorção ou melhorar a regeneração óssea. Acredita-se que este tratamento tenha um grande potencial na evolução dos pacientes com ON (PETRIGLIANO & LIEBERMAN, 2007).

Discute-se também o uso de anticoagulantes e vasodilatadores como parte do arsenal medicamentoso para o tratamento das ON, porém sua efetividade clínica ainda não é reconhecida (GLUECK *et. al.*, 2001).

O tratamento fisioterápico, com orientação para retirada parcial ou total da carga do membro afetado, evitando o desabamento da superfície articular, não altera a evolução do quadro clínico, a não ser nos casos de lesão em pequenas áreas que evoluem com cicatrização sem o dano ósseo, tendo como finalidade aliviar o quadro doloroso e tentar manter a mobilidade articular (GUARNIERO; ANDRUSAITIS; BRECH, 2005).

A terapia hiperbárica tem sido eventualmente utilizada no tratamento da ON, porém são poucas as evidências de que esse procedimento seja realmente efetivo (REIS *et. al.*, 2003).

#### b) Cirúrgico

Como abordagem cirúrgica, trazemos aqui as condutas geralmente empregadas na moléstia de Legg Perthes, por servirem de paradigma para diversos outros tipos de ON que requerem tratamento intervencionista.

#### **1) Procedimento cirúrgico com preservação da cabeça femoral:**

Os procedimentos cirúrgicos com preservação da cabeça femoral são feitos quando o diagnóstico da osteonecrose é realizado precocemente e ainda não ocorreu qualquer evidência do colapso articular visualizado tanto na radiografia simples quanto na TC e RNM. São eles:

- A descompressão nuclear

Ela se baseia na criação de um canal simples ou canais múltiplos, no colo femoral com uma fresa que se dirige até a área do osso necrótico com o intuito de diminuir a pressão medular intraóssea.

Pode-se adicionar a este procedimento a colocação de cimento ortopédico, osso esponjoso, matriz óssea desmineralizada, BMP ou transplante de células tronco. A colocação do cimento ortopédico nesse espaço serve para restaurar e manter a esfericidade da cabeça femoral evitando a inconveniência de retardar a carga total. Já o enxerto ósseo esponjoso, a matriz desmineralizada e o BMP servem para estimular a osteocondução e osteoindução no espaço criado pela fresa. O transplante de células tronco com enxerto de medula óssea autólogo, desenvolvido por Hernigou em 1990, no Hospital Henri Mondur em Creteil, França, é responsável por secretar citocinas angiogênicas importantes na remodelação da osteonecrose (HERNIGOU *et. al.*, 2008).

Trata-se de procedimento simples e seguro que, com a diminuição da pressão venosa óssea na região afetada, o paciente refere melhora significativa do processo doloroso.

A evidência científica mais recente parece sugerir que tal procedimento obtém tanto sucesso quanto outras estratégias de preservação conjuntas (SADILE *et. al.*, 2016).

#### ➤ Osteotomias

Baseiam-se no efeito biomecânico de se mover o segmento necrótico da cabeça femoral da maior área de carga para uma de menor pressão por meio de osteotomias em varo ou valgo, flexão-extensão ou rotatória da região proximal do fêmur. São procedimentos seguros e com bons resultados (GASBARRA *et. al.*, 2015).

## **2) Procedimento cirúrgico sem a preservação da cabeça femoral:**

#### ➤ Artroplastia de fusão (artrodese)

Procedimento que preconiza a fixação definitiva cirúrgica da articulação do quadril, levando à melhora do quadro doloroso, porém provocando grande limitação funcional articular principalmente em mulheres. Trata-se de cirurgia com resultado limitado devido à alta incidência de bilateralidade da doença (VICENTE *et. al.*, 2012).

#### ➤ Artroplastia de ressecção (Girdlestone)

Procedimento cirúrgico para retirada da cabeça femoral, evoluindo com melhora da dor, porém, criando um quadro clínico de encurtamento do membro inferior operado e diminuição da força e funcionalidade do membro (CORDERO-AMPUERO, 2012).

### ➤ Artroplastia total do quadril

Procedimento cirúrgico de substituição articular da cabeça femoral e do acetábulo por componentes protéticos fixados, com ou sem cimento ortopédico (metil metacrilato), na superfície óssea, levando a uma melhora da dor e da qualidade de vida do paciente, tanto no aspecto físico quanto social. Nas condições atuais, com a melhoria das técnicas cirúrgicas e tribologia, o índice de complicações – solturas sépticas ou assépticas bem como formação de lise óssea, debris e luxações – é possível antecipar uma sobrevida da prótese de mais de 25 anos, tornando-se um dos procedimentos cirúrgicos de maior sucesso deste século (HANNOUCHE *et. al.*, 2011).

## 3.3 ENXERTO ÓSSEO

### 3.3.1 Conceito e história

O enxerto ósseo, transferência de células ou fragmentos de tecido de um local para outro, vem desempenhando papel importante na cirurgia ortopédica reconstrutiva e corresponde a um tecido transplantado de um local para outro devido a perdas por traumas, infecções e ressecções de tumores (CATTO, 1965).

A literatura sobre o enxerto ósseo começou em 1682 com Van Meeken realizando um transplante de parte do crânio de um cão para uma falha óssea no crânio de um soldado, com sucesso. Depois de anos, ameaçado de heresia pela igreja, o soldado solicitou a retirada do enxerto canino do seu crânio, mas a realização do procedimento não foi possível devido à osteointegração obtida (KERRY *et. al.* 1998).

Ollier (1867), relatou a transferência cirúrgica de fragmento de osso e perióstio e, pela osteogênese que observou no enxerto, concluiu que ambos os tecidos estavam vivos. Já Barth, em 1893, discordava dessa conclusão revelando que o enxerto ósseo estava morto e que somente com a invasão de células do receptor haveria repovoamento de células vivas (GOSAIN, 2004).

No início do século XX, quando da realização de enxertias que preservassem o tecido periosteal, identificava-se células osteogênicas provindas dessa camada óssea (AXHAUSEN, 1907). Posteriormente, ficou comprovado que essas células osteogênicas superficiais

sobreviviam por difusão de nutrientes advindos do leito receptor (URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983).

Em 1918, Gallie & Robertson observaram que a qualidade osteogênica do osso esponjoso era melhor do que a do osso cortical (GALLIE & ROBERTSON apud ALBEE, 1996), e essa observação foi popularizada por Mowlem, em 1944.

Fazili *et. al.* (1978) relataram que o enxerto ósseo não estimulado, sofre reabsorção em 92% dos casos após 3 (três) anos do procedimento cirúrgico.

Avanços significativos acerca dos enxertos ósseos foram obtidos por Harakas (1984) que descreveu a presença, na matriz orgânica do osso, da proteína óssea morfogenética (BMP), responsável pelo estímulo de formação óssea independentemente de sua viabilidade.

### **3.3.2 Princípio da indução óssea**

Os primeiros questionamentos sobre os processos que determinam a neoformação óssea em sítios desprovidos deste tecido se baseavam na presença de uma substância indutora de formação óssea presente na matriz óssea. As células indutoras e as induzidas seriam originárias do hospedeiro e essas mesmas células indutoras seriam oriundas de histiócitos e células do tecido conjuntivo perivascular (URIST *et. al.*, 1983).

A propriedade de induzir a formação de osso é uma característica inerente a todo tecido ósseo, sendo observada, até mesmo, em implantes de osso desvitalizado. Osteoindução corresponde ao princípio fundamental de regeneração óssea desencadeado pela ação das proteínas morfogenética (BMP). As BMPs são moléculas pleiotropicas envolvidas na quimiotaxia, mitose e diferenciação de células mesenquimais no tecido ósseo e atuam diferentemente em ossos mineralizados e desmineralizados. No primeiro, a osteoindução é lentificada pela presença da BMPase, enzima que degrada a BMP e, no segundo, o princípio de indução óssea é preservado pela inibição daquela protease (BÜRING; URIST; 1967).

A osteoindução depende da interação substrato-célula onde após a colocação de osso desvitalizado num espaço receptor, surgem as câmaras de escavação formadas pela ação dos osteoclastos (URIST *et. al.*, 1983). Por difusão, a BMP alcança essas câmaras juntamente com células primitivas de tecido conjuntivo, induzindo sua transformação em células osteoprogenitoras que darão origem aos osteoblastos, promovendo a osteointegração do enxerto no hospedeiro (HARAKAS, 1984).

Wozney *et. al.* (1990) conseguiram obter, de uma sequência de aminoácidos de extrato altamente purificado, clones de DNA que continham o código de oito proteínas das quais sete foram denominadas BMP, apresentando características estruturais semelhantes. Com o isolamento dos polipeptídeos, determinou-se a sequência de vários aminoácidos, sendo possível a clonagem das BMPs de 2 a 9 (BMP-2 a BMP-9).

Em 2003, Cheng *et. al.* avaliaram a atividade osteogênica de 14 tipos de BMPs humanas e concluíram que um modelo hierárquico osteogênico no qual as BMPs-2, 6 e 9 podem desempenhar um papel importante na indução da diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, no entanto, a maioria delas é capaz de estimular a osteogênese a partir de osteoblastos maduros.

Atualmente, mais de 15 tipos de BMPs são conhecidas e diversas perspectivas de emprego são possíveis, seja na área odontológica seja na área médica (QUEIROZ *et. al.*, 2004). O efeito da BMP na formação da dentina reparadora foi identificado por Nakashima, em 1990, quando verificou que essas proteínas estimularam mitoses de células mesenquimais e induziram a diferenciação de osteodentinócitos. Já nas cirurgias ortopédicas de coluna, 11% dos enxertos ósseos são realizados com a associação do autólogo com BMP e 1,1% com BMP isoladamente (ALVES *et. al.*, 2013).

Tachi *et. al.* (2010) demonstraram que as BMPs conseguem induzir as células do hospedeiro a adotarem um destino condrogênico, depositando uma matriz extracelular rica em proteoglicans. O calo cartilaginoso resultante é então lentamente substituído pelo osso através do processo de ossificação endocondral. Além disso, as BMPs desempenham um papel em uma variedade de decisões de destino celular, envolvendo condrócitos, osteoblastos e osteoclastos. Há ainda um aumento da osteoclastogênese que resulta em reabsorção óssea ao invés de deposição óssea, e, portanto, uma revisão da compreensão tradicional da via BMP em terapêuticas clínicas pode ser justificada.

A proteína morfogenética óssea 9 (BMP9) é uma das BMPs mais osteogênicas e tem sido uma das menos estudadas. Sua função é regular a angiogênese em células endoteliais, contudo, não está claro se a sinalização para essa regulação desempenha qualquer papel importante na via osteogênica iniciada em células progenitoras do estroma mesenquimal (HU *et. al.*, 2013).

A engenharia de regeneração tecidual vem se desenvolvendo rapidamente no campo da biologia celular e molecular, fazendo com que o entendimento do padrão de expressão e da

correlação de BMPs possa levar a um maior sucesso na prevenção e tratamento da necrose asséptica avascular (SAMARA *et. al.*, 2013).

### 3.3.3 Tipificação

Os “Bancos de Ossos” espalhados pelo mundo têm como objetivo a captação de ossos para a reconstrução óssea, existindo diferenças na preferência por determinado tipo de osso, modo de preparo e o seu armazenamento (ALENCAR & VIEIRA, 2010). Desse modo, é necessário o completo conhecimento do osso e de suas propriedades biomecânicas e histológicas para que sua utilização possa vir a ser feita de forma adequada (PASSOS, 2013).

Os enxertos ósseos podem ser agrupados em:

1. Sintético;
2. Natural:
  - a. Enxerto ósseo vascularizado, quando existe um pedículo vascular preservado, nutrindo-o;
  - b. Enxerto ósseo não vascularizado ou convencional, quando não recebe aporte sanguíneo através de pedículo.

E são classificados de acordo com sua natureza em:

1. Autólogo ou autoenxerto – é o transplante de um osso de um local para outro em um mesmo doador, ou seja, o doador é também receptor;
2. Isólogo ou singênicos – é o enxerto permutado por indivíduos com características geneticamente idênticas, do mesmo zigoto;
3. Homólogo ou aloenxerto – é o transplante de um indivíduo da mesma espécie, mas com características genéticas desiguais;
4. Heterólogo ou xenoenxerto – é o transplante de um indivíduo de uma espécie para outra (FRIEDLANDER, 1987).

Os enxertos autólogos, embora tenham propriedades biológicas ideais, na maioria dos casos, apresentam limitação quanto à quantidade possível de ser retirada, principalmente em situações que requeiram um grande volume de enxerto, como nas revisões de artroplastias de quadril e cirurgias oncológicas reconstrutivas (ARO & AHO, 1993; OLIVEIRA *et. al.*, 2012).

### 3.3.4 Aspecto histológico

O processo de incorporação do enxerto ósseo na zona receptora apresenta uma sequência de nove etapas (HOBAR & BYRD, 1990):

1. O fragmento ósseo implantado, inicialmente, encontra-se solto no fluido serosanguíneo do hospedeiro, contendo leucócitos e histiócitos (macrófagos) e, após 12 dias, esse líquido é absorvido;
2. Em seguida, o enxerto é envolvido por tecido conjuntivo inflamatório formado por histiócitos migratórios ou macrófagos, linfócitos e fibroblastos, evidenciando o aumento da atividade osteoclástica;
3. A matriz antiga fica edemaciada, informe, mas ainda apresentando fibras colágenas íntegras;
4. As células do enxerto são destruídas e dão lugar a lacunas vazias ou com escassas células mortas;
5. Células do hospedeiro migram e ocupam os espaços medulares e canais vasculares;
6. Enzimas proteolíticas dos macrófagos e células gigantes multinucleadas do osso receptor, reabsorvem a matriz antiga dilatando os canais vasculares antigos, originando as câmaras de escavação;
7. Cerca de um mês depois, as células de tecido conjuntivo primitivo que ocuparam as câmaras de escavação se diferenciam e se agrupam em camadas, dando origem ao osso novo posicionado na superfície da matriz óssea morta;
8. Um processo contínuo de formação e reabsorção de osso novo ocorre pela ação alternada de osteoblastos e osteoclastos. Finalmente, forma-se um novo sistema haversiano bem como, por diferenciação celular, forma-se a medula hematopoiética central;
9. Após 6 meses, o osso incipiente formado na matriz óssea implantada torna-se necrótico, é lentamente absorvido e substituído por tecido fibroso.

A sequência descrita pode ser, assim, resumida: início do processo inflamatório; revascularização do enxerto; osteocondução – onde o enxerto tem a função de arcabouço para o crescimento de vasos e formação de osso; osteoindução – onde as células mesenquimais (células de tecido conjuntivo primordiais) do hospedeiro são induzidas, por proteínas ósseas morfogenéticas encontradas no enxerto, a se transformarem em osteoblastos; e remodelação óssea com características de formação e reabsorção contínua de osso. Vale ressaltar que toda

essa sequência só ocorre quando o enxerto é posicionado num sítio ósseo do receptor (HOBAR & BYRD, 1990).

O sucesso do enxerto ósseo está relacionado à sua atividade osteoindutora e à resposta imunológica causada pela histocompatibilidade enxerto-hospedeiro (FRIEDLANDER, 1987).

Fisiologicamente, o enxerto ósseo não vascularizado após ser obtido do osso doador e transferido para o leito receptor, necessita dos tecidos vizinhos para ser nutrido e sobreviver. Por meio da liberação de fatores hormonais pelos tecidos vizinhos em direção ao enxerto, ocorre a promoção da angiogênese, seguida de sua revascularização (BAUER & MUSCHLER, 2000; NEVES *et. al.*, 2014).

Estudos demonstram que os enxertos ósseos não vascularizados necessitam em torno de cinco semanas para readquirirem uma vascularização com função osteogênica e que a maioria das células entram em estado necrótico (BAUER & MUSCHLER, 2000; PERUCHI *et. al.*, 2012).

Sempuku *et. al.* (1993) afirmaram que, uma semana após a transferência para o leito receptor, todo enxerto fica necrosado, sendo reabsorvido; e a presença do osso neoformado ao redor do enxerto é detectado somente após cinco semanas, sugerindo que a revascularização do enxerto e a formação óssea ocorrem por substituição a partir do leito receptor.

Os enxertos de osso cortical têm um perfil biológico mais limitado em comparação com os enxertos esponjosos. O osso cortical tem menos osteoblastos e osteócitos, menos fatores de crescimento e menor área de superfície por unidade de peso, logo, a sua estrutura se constitui numa barreira ao crescimento interno vascular e à remodelação. O osso cortical não fornece boa estabilidade mecânica inicial, nem força para construção de fixações ósseas em comparação com os enxertos de osso esponjoso. Na atividade osteoclástica, a reabsorção das corticais densas começa com a perda óssea após duas semanas da enxerto. Isso resulta em fraqueza transitória com redução da resistência mecânica em até 75% (GOLDBERG *et. al.*, 1990; MILORI *et. al.*, 2013).

Diferenças na incorporação do enxerto entre os ossos cortical e esponjoso tornam-se evidentes durante a fase de revascularização e remodelação. O processo de revascularização do osso cortical leva cerca de 2 (dois) meses, pois a sua estrutura não permite uma grande área de contato de interação entre o enxerto e o hospedeiro, sendo necessário que os osteoclastos reabsorvam as corticais densas para permitir a vascularização. Em contraste, os enxertos esponjosos têm sua incorporação iniciada pela formação de osso novo (MILORI *et. al.*, 2013).

Estudos em cães têm mostrado que os enxertos corticais diminuíram significativamente a vitalidade em 6 (seis) semanas, mantendo-se assim durante 24 semanas, recuperando a

viabilidade após 48 semanas do transplante. Essa característica desse tipo de transplante parece estar relacionada com a quantidade de porosidade da matriz ao invés da qualidade ou completude do reparo biológico. A reabsorção inicial causou aumento da porosidade que foi compensada lentamente pela aposição de osso novo, um processo que dependia da atividade metabólica geral do esqueleto. Embora a viabilidade fosse quase normal após as 48 semanas, apenas 60% dos transplantes tinham sido remodelado (ENNEKING *et. al.*,1975).

A rejeição de um aloenxerto ósseo é histologicamente expressa pela ruptura de vasos e pelo processo inflamatório conduzido por linfócitos, seguido pelo encapsulamento fibroso, reabsorção do enxerto periférico, calo-ponte, pseudo artroses e fraturas por fadiga (GLOWACKI, 1998; DOBRUCKI & SINUSA, 2007).

Trabalho realizado por Baptista *et. al.* (2003), comparou as alterações histológicas do aloenxerto de fêmur distal de cadáver humano, após criopreservação a - 80 °C em relação a um grupo controle conservado a 4 °C. A microscopia revelou a presença de osteoclastos, osteoblastos, estroma vascular e ossos imaturo e lamelar. Foram descritas áreas de necrose óssea em todos os cortes analisados, queda na qualidade da vascularização, redução da matriz óssea. A viabilidade celular foi definida pelo aspecto nuclear da célula, pela presença de nucléolo e pela integridade da membrana nuclear.

O sinal histológico indicativo de osteonecrose corresponde às lacunas osteocíticas e a perda dos osteócitos que só estará completa entre a segunda e quarta semanas após o início da isquemia (GLOWACKI,1998). Essa sequência de eventos ocorre nos espaços da medula, quando a partir do segundo dia percebe-se a perda de coloração nuclear das células da medula e espaços grandes redondos e ovoides cheios de gordura. Após 15 dias, as lacunas osteocíticas já estão formadas e a superfície trabecular está desprovida de células (McCARTHY, 1982).

Durante o processo histológico evolutivo da osteonecrose, haverá a remoção do tecido morto pelos osteoclastos do tecido receptor e a sua substituição por novas trabéculas. É neste arcabouço mineral inerte que aparecerá um novo tecido ósseo (GERBER *et. al.*,1999).

Na doença de Legg Perthes, a maior parte da cabeça femoral não será totalmente revascularizada, decorrente talvez de episódios de necrose recorrentes, haja vista a observação de dois tipos de tecido necróticos: tipo I, que apresenta tecido fibroso jovem com grande atividade osteogênica com ou sem tecido ósseo de reparação; e tipo II, com envolvimento de uma borda avançada de tecido de granulação maduro sem atividade osteogênica (INOUE *et. al.*, 1976; TREMOLEDA *et. al.*, 2011).

### 3.4 ANGIOGÊNESE – INTEGRINA – PEPTÍDEOS COM SEQUÊNCIA ARGININA – GLICINA – ÁCIDO ASPÁRTICO (RGD)

A angiogênese é um processo de formação de neovasos sanguíneos derivados de vasos pré-existentes e é amplamente considerado como um meio essencial para garantir o fornecimento de nutrientes e oxigênio para os tecidos isquêmicos envolvendo a interação entre células e componentes da matriz extracelular (ENNEKING *et. al.*, 1975).

A vascularização é considerada como um dos fatores principais que garantem a qualidade do osso transferido. O processo de osteogênese é determinado pela interação sequencial de osteoclastos, osteoblastos e angiogênese (AXHAUSEN, 1907).

Uma das etapas iniciais e essenciais da angiogênese é o aumento da permeabilidade vascular, que leva a uma exsudação do plasma, e a subsequente formação de matriz osteogênica (DOBRUCKI & SINUSA, 2007).

A proliferação e a migração de células endoteliais é seguida pela tubulização e perfusão dos novos vasos formados. Depois da vascularização, com a proliferação de células osteoblásticas e com a produção de matriz osteogênica, a neoformação óssea pode começar (GLOWACKI, 1998).

A formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos. Ela é essencial no desenvolvimento dos órgãos, na cura de ferimentos e em processos inflamatórios, sendo rigorosamente regulada pelo organismo. A angiogênese também está envolvida em doenças como artrite reumatoide e retinopatia diabética (DOBRUCKI & SINUSA, 2007).

O arcabouço trabecular do osso esponjoso apresenta uma extensa superfície de contato, permitindo que um grande número de componentes celulares, como as células mesenquimais e osteoblastos, sejam incorporados a ela e isso explica a sua excelente capacidade osteogênica e osteoindutora. Essa estrutura descrita, permite também a fácil incorporação e revascularização do enxerto, porém uma das suas limitações é a falta de resistência mecânica inicial.

Hernigou (2014) também observou essa fragilidade óssea do osso novo sobre uma estrutura necrótica, porém chamou a atenção que a estabilidade era então alcançada dentro de poucos meses. Uma vez que o enxerto fosse incorporado, a revascularização começaria dentro de 2 dias após a colocação do implante e seria acompanhada por infiltração dos espaços

medulares por células mesenquimais. À fase inicial de osteointegração com revascularização, seguiria a remodelação do enxerto com a formação óssea ativa e reabsorção do osso necrosado após 4 (quatro) semanas (KHAN *et. al.*, 2005; HERNIGOU, 2014).

A angiogênese envolve muitos mediadores incluindo as integrinas. Essas fazem parte de uma grande família de glicoproteínas receptoras da superfície celular e apresentam duas subunidades, designadas de:

1.  $\alpha$  (maior, com 120-170 kDa)
2.  $\beta$  (menor, com 90-100 kDa), associadas de maneira não covalente. Elas incluem o receptor  $\alpha\beta3$ , que interage com moléculas de adesão da família das imunoglobulinas.

Os ligantes das integrinas possuem papel crítico em processos fisiológicos, incluindo ligação às células, proliferação, remodelação óssea e cicatrização de feridas. Além disso, podem contribuir em eventos patológicos como trombose, aterosclerose, invasão tumoral e metastática, infecções por microrganismos e disfunções imunes (GLOWACKI, 1998; LIU *et. al.*, 2008).

A família das integrinas é composta por 25 membros identificados que são heterodímeros de 19 subunidades  $\alpha$  e oito subunidades  $\beta$ . Correspondem a proteínas de adesão celular que controlam a ligação à membrana extracelular. A integrina  $\alpha\beta3$  é altamente expressa em células endoteliais ativas na neovascularização tumoral (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010). Essas integrinas reconhecem a sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) e foram descobertas na fibronectina por Pierschbacher e Ruoslahti em 1983.

Os domínios extracelulares de muitas integrinas reconhecem o tripeptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) encontrados em várias macromoléculas extracelulares, tais como fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e osteopontina (ZHOU; CHAKRABORTY; LIU, 2011)

Os peptídeos são proteínas que desempenham um papel crucial em quase todos os processos biológicos. São constituídos de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas, possuindo favorável distribuição nos tecidos, como uma rápida depuração sanguínea em tecidos não-alvo (KHAN *et. al.*, 2005).

Alguns peptídeos têm boa permeabilidade, permitindo rápido acesso aos tecidos e órgãos de interesse e geralmente apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, sendo bastante flexíveis em modificações químicas e radiomarcações (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

Muitos peptídeos têm o papel de reguladores das funções e crescimento celulares, não apenas em condições normais, mas também em processos patológicos, como por exemplo, na qualidade de ligantes de receptores (SIGNORE *et. al.*, 2001).

Peptídeos lineares RGD mostraram-se altamente susceptíveis à degradação devido à reação do resíduo de ácido aspártico com a estrutura do peptídeo. Além das pesquisas terem evoluído de RGD linear para RGD cíclico, estudos recentes foram realizados com moléculas RGD dímeras, tetrâmeras e octâmeras, demonstrando uma afinidade maior de ligação a novos vasos sanguíneos (KHAN *et. al.*, 2005; PIERSCHBACHER & RUOSLAHTI, 1983).

Os peptídeos radiomarcados são um caso particular de radiofármaco, sendo utilizados em diversas áreas de interesse, como na oncologia, neurologia, cardiologia, na pesquisa de focos de infecção/inflamação e nas pesquisas de trombose/esclerose (DIJGRAAF *et. al.*, 2007).

### 3.5 INTERESSES EM MODELOS EXPERIMENTAIS

De acordo com a revisão sistemática realizada por Fan *et. al.* (2011), os modelos animais de ON da cabeça do fêmur vêm sendo utilizados em pesquisas médicas há muitos anos. A referência mais antiga encontrada por esses pesquisadores data de 1981.

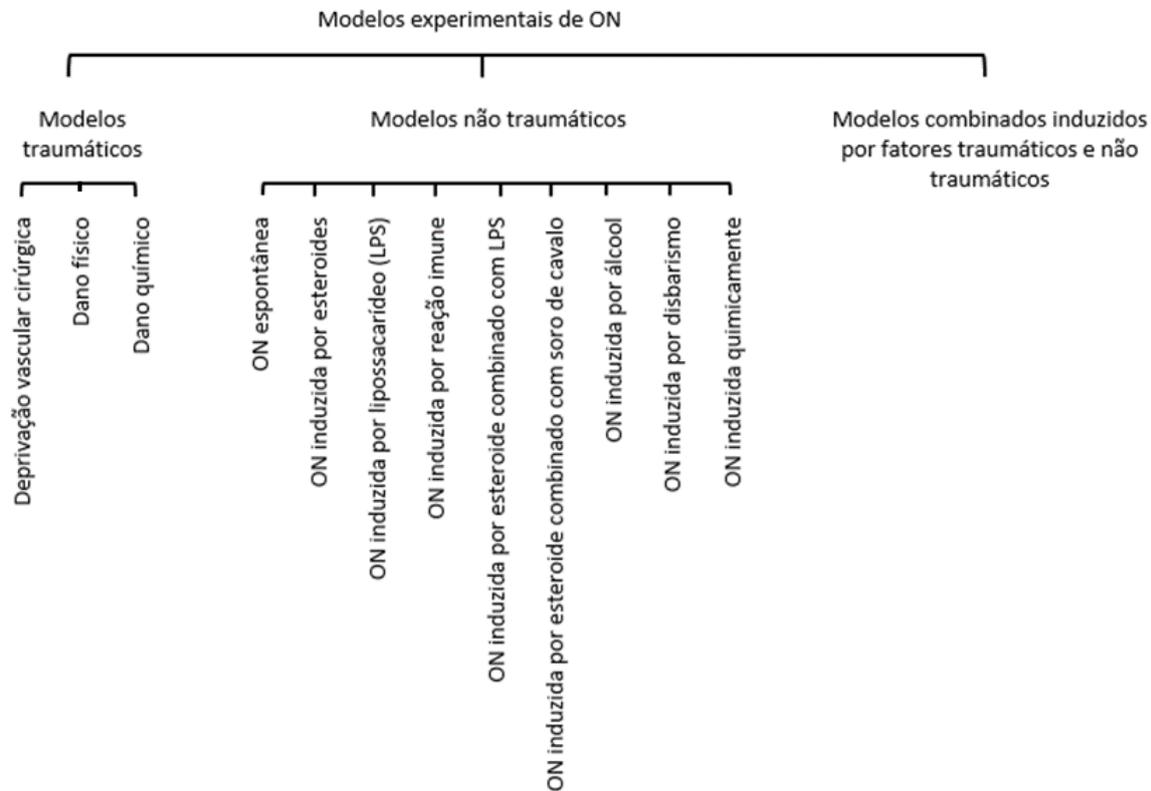
Eles discutem as vantagens e desvantagens de se comparar a fisiopatologia e a eficácia de distintos tratamentos propostos, recorrendo-se a modelos animais que mimetizem, ainda que parcialmente, a ON da cabeça femoral e de outras unidades esqueléticas em humanos.

O modelo animal ideal para ON seria aquele que apresenta uma alta incidência de colapso articular, seguida de uma ação reparadora do osso necrótico, que pudesse ser acessível e reprodutível (FAN *et. al.*, 2011).

Múltiplos modelos pré-clínicos em animais – rato, coelho, porco, cabra, cachorro, galinha e ema – têm sido relatados e descritos como potencialmente vantajosos para prevenir e tratar experimentalmente a ON, antes de se partir para aplicações clínicas (ARO & AHO, 1993).

Tais modelos recorrem a uma variedade de artifícios traumáticos e não traumáticos (físicos ou químicos) como demonstrado na Figura 1. De uma maneira geral, se caracterizam por provocar danos articulares diretos ou indiretos tais como a luxação da cabeça femoral; a privação do suprimento sanguíneo ósseo; a utilização de drogas indutoras de necrose, tanto por via sistêmica quanto por instilação local; os danos ósseos criogênicos ou térmicos; a avulsão de um fragmento ósseo e seu reposicionamento em região anatômica distinta; dentre outras possibilidades (LOOKER *et. al.*, 2000; FAN *et. al.*, 2011).

**Figura 1– Modelos animais experimentais de osteonecrose**



Adaptado de Fan *et. al.*, 2011).

A grande maioria dos modelos animais exige longos períodos de observação, da ordem de meses, como no caso daqueles que usam drogas indutoras locais ou sistêmicas. A eficácia desses protocolos não é absoluta, sendo necessário utilizar um número grande de espécimes para se atingir algum resultado (SHABAT *et. al.*, 2004).

Os procedimentos intervencionistas são mais confiáveis, sobretudo as desvascularizações extensas e a fratura com avulsão de um segmento ósseo, porém envolvem custos não desprezíveis em função da equipe, das instalações e instrumental específico necessários para a realização dos procedimentos. Em ambas as circunstâncias, o animal necessita ser imobilizado por períodos longos ou, espontaneamente, se recolhe por causa da dor e da incapacidade física subsequentes. Mesmo que essa redução de mobilidade simule os modelos humanos de ON em membros inferiores, a falta de apetite e a redução da alimentação acabam por ocasionar a morte dos espécimes, característica indesejável quando se trata de modelos experimentais de estudo (PELED *et. al.*, 2009).

## 4 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), São Paulo-SP, Brasil e ambos seguiram os "Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório" (NIH publicação 8023, revisada em 1978 e 86 23, revisada em 1985) e as diretrizes nacionais para experimentação animal estabelecidas pelo Comitê de Ética Científica, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Comitê Nacional de Energia Nuclear, Brasil e pelo Colégio Brasileiro de Investigação Animal (Parecer-Projeto nº 93/11/CEUA-IPEN/SP).

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Equipamentos

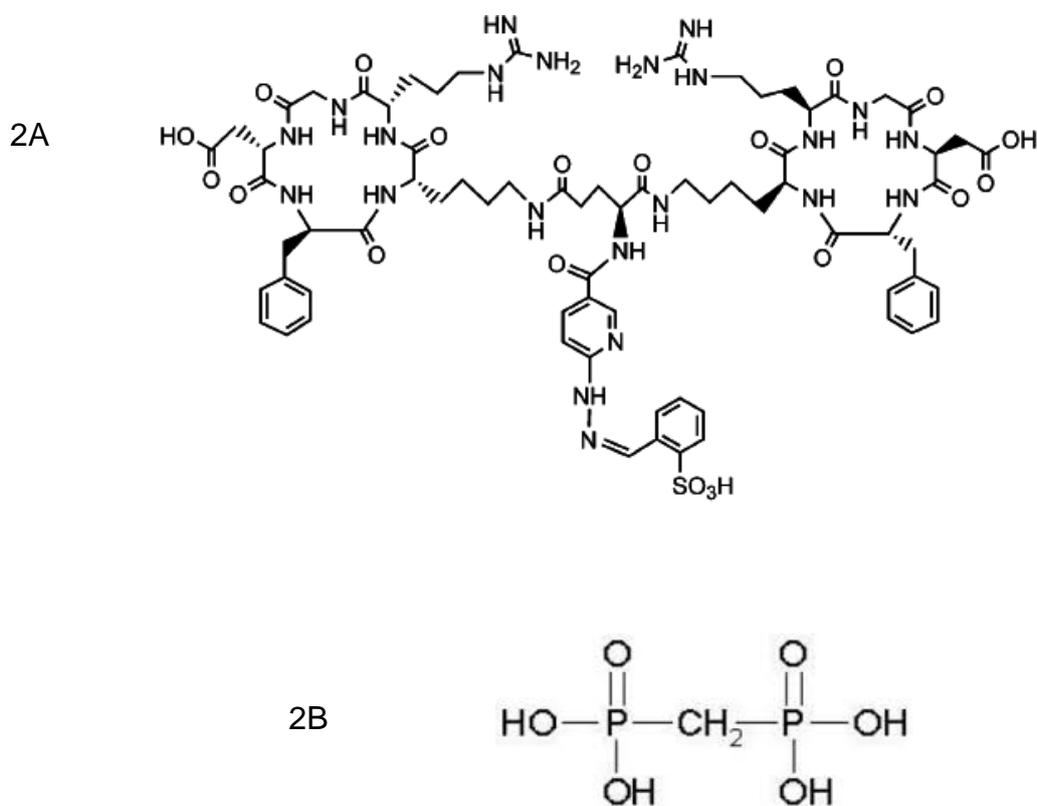
- Agitador de tubos, modelo AP56 – Phoenix, Brasil;
- Aquecedor Thermomixer comfort R (0-100°C) - Eppendorf®, EUA;
- Balança analítica, modelo M-220 – Denver Instruments, EUA;
- Bomba de Água TP500 – Gaymar Solid State, EUA;
- Bomba de vácuo, modelo 825 T – Fisaton®, Brasil;
- Calibrador de doses, modelo CRC-15R – Capintec Inc., EUA;
- Capela com sistema de exaustão – BRASLAB Equipamentos para Laboratório Ltda., Brasil;
- Centrífuga, modelo HIMAC-CF 7D2 – HITACHI, EUA;
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (Tl), modelo D5002, Cobre®, auto-gamma, A. Packard, Camberra, EUA;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – Fase Reversa (RP-HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japão) com coluna Symmetry C-18 (5,0 mm, 100°, 4,66250 mm, Waters, Milford, MA, EUA).
- Detector de radiação tipo poço, modelo Nuclear Spectrometer LB2040, Berthold, Alemanha;
- Estufa, modelo Orion 515 – Farrem, Brasil;
- Freezer vertical com temperatura de -70 °C – Eletrolab, Brasil;
- Gama-câmara equipada com os seguintes módulos: Detector Gama -

- Colimador, Software Console TH22 v.7.02, Software InterviewXP® v1.05.014 – Mediso, Hungria.
- Preclinical System PET/SPECT/CT, Bruker (Billerica, MA, USA).
- Medidor de pH, modelo DM-31 – Digimed, Brasil.
- Purificador de água Ellox acoplado a um sistema de purificação MilliQ, EUA.
- Refrigerador Biflex 450 L Frostfree, Bipler 450 – C&S, Brasil.

#### 4.1.2 Reagentes e solventes

- Todos os produtos químicos utilizados foram de grau reagente (Sigma-Aldrich e Merck®, São Paulo, Brasil)
- O peptídico conjugado homodímero cíclico arginina-glicina-ácido aspártico e o análogo da D-fenilalanina-lisina com ácido glutâmico para ligar os dímeros [abreviado (HYNIC-E- [c(RGDfK)]<sub>2</sub>) (PM 1453,6, pureza peptídica: 95%) foi adquirido da CPC Scientific Inc. (Sunnyvale, CA, EUA) como um pó liofilizado (Figura 2A). O conjugado foi dissolvido em água estéril numa concentração de 687,94µM e foi armazenado a -20°C.
- O kit de ácido Medrônico liofilizado é composto por 10mg de ácido medrônico (Figura 2B), 1,2mg de cloreto de estanho desidratado e 2 mg de ácido paraminobenzoico produzido no Centro de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Comissão Nacional de Energia Nuclear - IPEN / CNEN, São Paulo-SP, Brasil.
- Tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc), sob a forma de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>), diluído em solução salina a partir de um gerador <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc à base de alumina, fornecidos pelo mesmo Centro de Radiofarmácia, IPEN/CNEN, São Paulo-SP, Brasil.

Figura 2 - Estrutura de conjugado  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (A) e do ácido difosfônico de metileno (MDP) (B)



#### 4.1.3 Outros

- Fitas cromatográficas de camada delgada de sílica gel (ITLC), 5 × 20 cm (Pall Corporation, NY, EUA).
- Papel de filtro para cromatografia Whatman 3 mm.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Marcação do MDP com $^{99m}\text{Tc}$

O kit liofilizado contendo 10 mg de ácido Medrônico, 1,2 mg de cloreto de estanho desidratado e 2 mg de ácido paraminobenzoico foi reconstituído a partir de 3 ml do eluído de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  em solução esterilizada de soro fisiológico, com uma atividade de 30 mCi (1,110

MBq). O frasco foi agitado e mantido à temperatura ambiente durante 15 minutos para o processo de reação.

#### 4.2.2 Marcação de HYNIC-E-c(RGD)<sub>2</sub> com <sup>99m</sup>Tc, usando EDDA/tricina como coligantes

O conjugado foi primeiramente dissolvido em água estéril a uma concentração de 687,94 μM e armazenado a -20 °C.

O processo de marcação foi realizado como anteriormente descrito por Faintuch *et. al.* (2005). Em um frasco de reação selado contendo 20 mg de tricina e 5 mg de ethilenediamina-N,N'-ácido diacético (EDDA), foi adicionado 0,5 mL de solução tampão de fosfato 0,1M, previamente nitrogenada, para a dissolução dos sais. Em seguida, adicionou-se 10μl da solução mãe (687,94 μM) do conjugado HYNIC-E-c(RGDfK)<sub>2</sub>, 8,9 μM de uma solução de cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) em ácido clorídrico (HCl) (0,1N), previamente nitrogenada e 500 μL de Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (1.850 MBq). O frasco foi aquecido durante 20 minutos a 100 °C e resfriado a temperatura ambiente. O pH da reação final foi de 7. Após resfriamento, o volume foi completado para 1,5 ml com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, previamente nitrogenada.

#### 4.2.3 Controle radioquímico

- **Avaliação da pureza radioquímica do <sup>99m</sup>Tc-MDP**

A avaliação radioquímica do <sup>99m</sup>Tc-MDP foi realizada por cromatografia em papel ascendente, utilizando tiras de papel Whatman 3mm, como suporte, e dois sistemas de solventes constituídos por acetona e cloreto de sódio a 0,9%.

- **Avaliação radioquímica de <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>**

Avaliação radioquímica de <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> foi realizada por cromatografia de camada delgada em fitas de sílica gel (ITLC-SG), usando dois sistemas de solventes, a metiletilcetona e acetonitrila a 50%. O cálculo radioquímico foi determinado em porcentagem de atividade de cada espécie radioquímica em relação à atividade total da fita, sempre de acordo com o fator de retenção (R<sub>f</sub>) correspondente.

Os resultados obtidos com ITLC foram confirmados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando uma coluna C18 (5,0mm, 100Å, 4,6 x 250mm) e uma fase reversa com fluxo de 1,0ml/min.

O sistema de solventes consistiu de água contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente A) e acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente B). O sistema de gradiente HPLC iniciou-se com uma composição de solventes de 95% A e 5% de B, e seguiu de um gradiente linear de 30% A e 70% B de 0 a 25 min, e 5% de A e 95% de B dos 25-30 min.

#### 4.2.4 Estudos biológicos

- **Os animais**

Foram utilizados 93 (noventa e três) Camundongos Swiss singênicos da espécie *Mus musculus*, fêmeas, com 8 (oito) semanas de vida e peso de aproximadamente 20g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do IPEN /CNEN, São Paulo-SP, Brasil.

- **Amostras estudadas**

No presente protocolo, optou-se por um modelo não específico, barato, que não utilizasse drogas e que fosse facilmente disponível, com o objetivo de avaliar a evolução de um fragmento esquelético (fêmur), submetido à isquemia prolongada.

Doze camundongos foram utilizados para se avaliar a biodistribuição dos radiomarcadores, pois, como não existem trabalhos que prestam esta informação, houve a necessidade de se estabelecer um parâmetro estatístico relevante. Desses animais, 6 (seis) receberam o conjugado  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP por via de injeção na veia caudal e outros 6 (seis) receberam o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>.

Vinte e sete roedores foram utilizados como doadores de fêmures (2 fêmures de cada doador).

Cinquenta e quatro camundongos foram divididos em 3 (três) grupos distintos, a saber:

Grupo 1 – Onde 12 (doze) camundongos receberam fêmures doados, com o objetivo de avaliar a biodistribuição do radiomarcador  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP.

Grupo 2 – Onde 12 (doze) camundongos receberam fêmures doados, com o objetivo de avaliar a biodistribuição do radiomarcador  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>.

Grupo 3 – Onde 30 (trinta) camundongos receberam fêmures doados com objetivos diversos: avaliar a histologia óssea (12 animais), obter imagens de tomografia computadorizada, obter imagens macroscópicas representativas diversas (enxerto ósseo, fotografias ilustrativas etc.).

- **Habitação e manuseio dos animais**

Os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais, sob um ciclo artificial de noite-dia de 12h/12h e condições patogênicas controladas. Também receberam água e comida específica para roedores *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados em laboratório. Os materiais radioativos, incluindo os animais sacrificados, ficaram em quarentena até o decaimento dos radioisótopos e foram descartados, de acordo com as diretrizes internacionais (Agência Internacional de Energia Atômica).

- **Avaliação da biodistribuição dos radiofármacos em diferentes órgãos e tecidos**

Os 12 (doze) animais divididos em 2 (dois) grupos de 6 (seis), 1h após receberem o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e o  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>, respectivamente, foram sacrificados por meio de overdose anestésica. Seus órgãos e tecidos – sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino delgado, intestino grosso, músculo e osso – foram excisados e pesados (balança analítica de 4 casas decimais, modelo M-220 – Denver Instruments®, USA) e a radioatividade foi medida com contador gama (Cobra 5002, Packard, USA), sendo que a dose captada pelo órgão ou tecido foi calculada a partir de uma dose injetada padrão. No contador gama, obteve-se a dose total de captação no órgão ou tecido medida em contagens por minuto (cpm) calculada por meio de regra de três. Os resultados expressaram as porcentagens da dose injetada por grama (%ID/g).

- **Implantação subcutânea do fêmur**

Os 27 (vinte e sete) animais doadores de fêmures foram sacrificados por meio de overdose anestésica e ambos os fêmures de cada animal foram excisados cirurgicamente, perfazendo um total de 54 fêmures doados.

Os 54 (cinquenta e quatro) camundongos receptores dos Grupos 1, 2 e 3 foram anestesiados com 1ml/kg de ketamina e 0,5 ml/kg de xilazina IP e raspados para intervenção cirúrgica. Uma incisão cutânea transversal foi realizada no lado direito do abdômen, entre a última

costela e o quadril, onde, cada um dos fêmures doados foi implantado numa bolsa subcutânea criada nesse local. Após a implantação de cada fêmur doado, a incisão foi suturada e nenhuma marca na pele foi necessária, pois o osso implantado era facilmente palpado.

Os roedores foram deixados para se recuperarem com água e comida. A água fornecida nos primeiros cinco dias do pós-operatório continha um antibiótico (oxacilina) e um analgésico (acetaminofeno).

- **Tomografia computadorizada**

Imagens tomográficas de corpo inteiro foram realizadas em sistema pré-clínico PET/SPECT/CT de animal de pequeno porte (Bruker®, Billerica, MA, USA). Por razões técnicas, os momentos da aferição imagética foram reduzidos a apenas dois, o *baseline* (implantação óssea) e no final do experimento (60 dias).

- **Captação do radiofármaco em fêmur enxertado versus fêmur controle**

Os 24 (vinte e quatro) camundongos do Grupo 1 e 2 foram separados em 6 (seis) subgrupos A, B, C, D, E e F de 4 (quatro) animais cada. Os subgrupos A e B foram avaliados com 15 dias; o C e o D, com 30 dias e o E e o F, com 60 dias. Após 15, 30 e 60 dias, os animais dos subgrupos A, C e E receberam o conjugado  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  e os subgrupos B, D e F receberam o  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ .

Para a aquisição de imagens, os animais foram anestesiados e colocados horizontalmente sob o colimador de baixa energia e alta resolução (LEHR, Mediso Imaging System, Budapeste, Hungria). As imagens foram adquiridas 3 minutos antes do sacrifício, utilizando uma matriz com tamanho de 256 x 256 x 16, com janela de energia de 20%, fixado em 140 keV por um período de 180 segundos.

Em seguida, os animais foram sacrificados e tanto o fêmur enxertado quanto o fêmur ortotópico homolateral do receptor utilizado como controle foram excisados, pesados (balança analítica de 4 casa decimais, modelo M-220 – Denver Instruments, USA) e a radioatividade foi medida com contador gama (Cobra 5002, Packard, USA).

- **Imagens macroscópicas dos espécimes**

Enxertos ósseos e fêmures controles de camundongos do Grupo 3 foram fotografados em diferentes momentos com propósitos ilustrativos e representativos. Por não contar com suporte, equipamento fotométrico ou software, distorções em imagens pequenas podem ter ocorrido.

- **Avaliação histológica**

Doze camundongos do Grupo 3 foram separados em 3 (três) subgrupos G, H e I de 4 (quatro) animais cada. O subgrupo G foi avaliado com 15 dias; o H, com 30 dias e o I, com 60 dias. Após 15, 30 e 60 dias, os roedores de cada subgrupo (não houve administração de radiomarcadores) foram sacrificados e tanto o fêmur enxertado quanto o fêmur ortotópico homolateral do receptor (controle) foram excisados.

O material assim obtido foi fixado em solução de formalina tamponada e descalcificado por 30 (trinta) dias, sendo, em seguida, incluído em blocos de parafina. Lâminas representativas da diáfise média e da área subcondral foram então processadas para a rotina de hematoxilina e eosina e examinadas ao microscópio ótico.

#### **4.2.5 Análise estatística**

Os resultados que envolveram as radiomarcações, as imagens tomográficas e a histologia foram interpretadas por profissionais “cegos”, tanto para os grupos e subgrupos quanto para o tempo do experimento, para evitar qualquer interferência consciente ou não nos resultados.

E os demais resultados foram apresentados como porcentagem ou como média  $\pm$  desvio padrão. A comparação de resultados numéricos foi feita por teste de Student ( $t$ ) ou análise de variância, usando o Statistical Package SPSS 17.0 (2012). A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

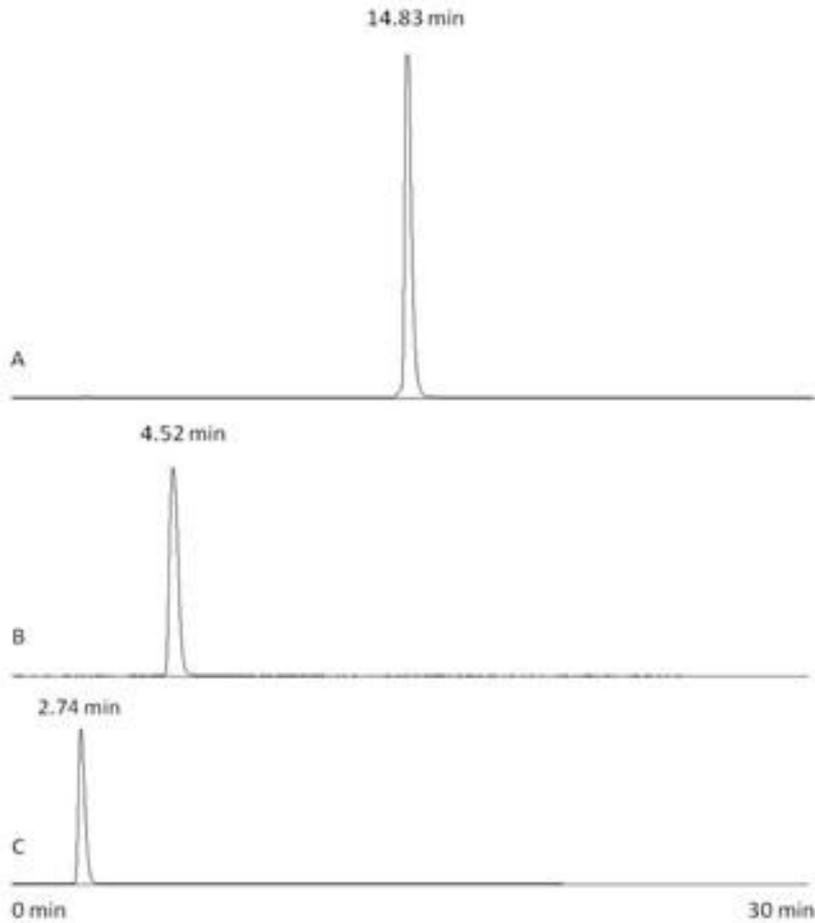
Foi estudada a pureza radioquímica de ambos os conjugados –  $^{99m}\text{Tc}$  das moléculas de MDP e de HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>.

A eficiência da radiomarcagem do MDP foi avaliada por cromatografia em papel, utilizando um sistema de solventes, tendo como resultado  $97,42 \pm 0,89\%$ . Em ambos os solventes, a acetona e a solução de cloreto de sódio 0,9%, a impureza do pertecnetato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) teve um fator de retenção igual a 1 ( $R_f = 1$ ). A impureza do coloide  $^{99m}\text{TcO}_2$  foi quantificada e o fator de retenção foi igual a 0 ( $R_f = 0$ ). O  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP, no primeiro solvente, ficou junto com o coloide e, no segundo solvente, o fator de retenção foi o mesmo que o encontrado para o pertecnetato.

O radiocromatograma obtido no HPLC (Figura 3) para o  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> demonstrou um único pico a 14,83 min, com uma pureza radioquímica de  $98,85 \pm 0,23\%$ .

A figura 3 mostra também os picos das impurezas de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina. A quantidade de coloide ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) só pode ser detectada nas fitas de ITLC-SG, e estava na faixa de 0,13%.

**Figura 3 - Radiocromatograma: (A)  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>; (B)  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ , (C)  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina**



Os resultados da biodistribuição dos radiotraçadores  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> obtida para órgãos e tecidos – sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino delgado, intestino grosso, músculo e osso – de camundongos Swiss sadios foram registrados na Tabela 1, sendo expressos em porcentagens da dose injetada por grama (% ID/g).

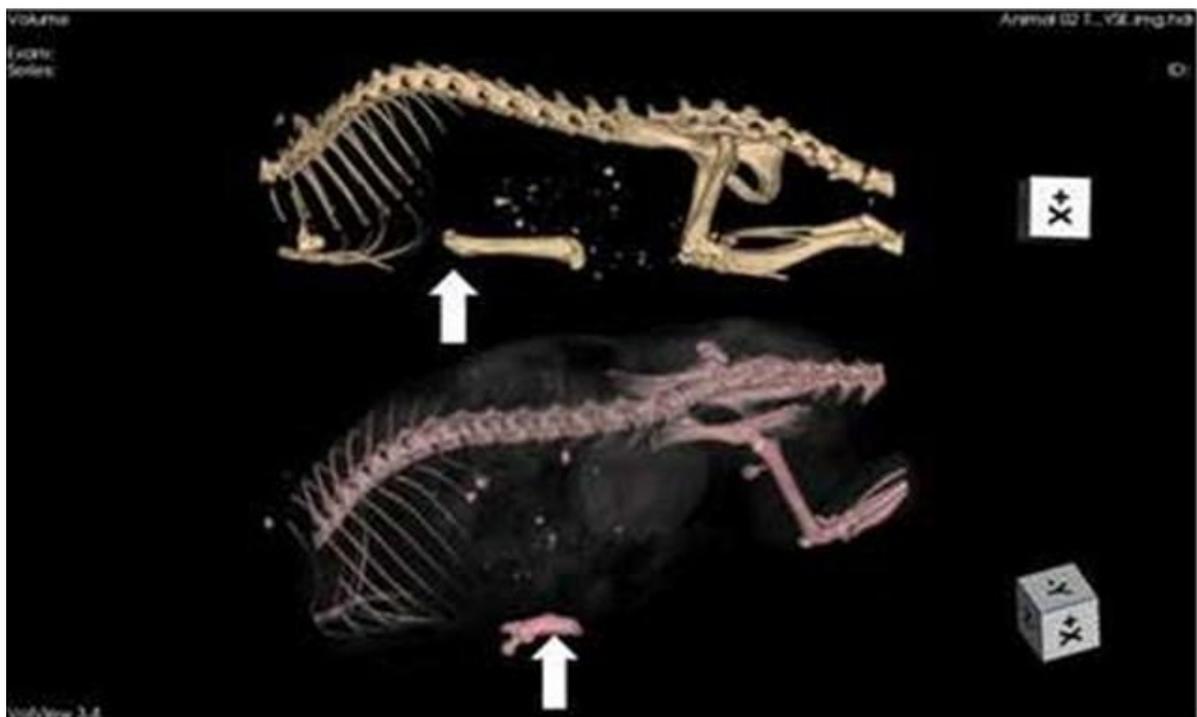
**Tabela 1 - Biodistribuição de radiotraçadores em camundongos Swiss sadios (% DI/g). (Dose injetada)**

Órgãos/tecidos	$^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	$^{99m}\text{Tc-MDP}$
Sangue	$0,37 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,04$
Coração	$0,96 \pm 0,26$	$0,50 \pm 0,11$
Pulmão	$2,59 \pm 0,27$	$1,15 \pm 0,35$
Rins	$9,81 \pm 1,19$	$3,98 \pm 0,38$
Baço	$3,45 \pm 0,81$	$4,00 \pm 0,97$
Estômago	$0,96 \pm 0,18$	$0,68 \pm 0,13$
Pâncreas	$0,67 \pm 0,17$	$0,38 \pm 0,08$
Fígado	$2,77 \pm 0,87$	$2,36 \pm 0,44$
Intestino Delgado	$2,75 \pm 0,57$	$0,54 \pm 0,09$
Intestino grosso	$4,21 \pm 1,06$	$0,54 \pm 0,12$
Músculo	$0,57 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,06$
Osso	$1,77 \pm 0,23$	$14,79 \pm 1,82$

Fonte: FAINTUCH *et. al.*, 2008.

Após a implantação dos fêmures singênicos nos camundongos Swiss (*baseline*), a tomografia computadorizada foi realizada e, depois de 60 dias, o exame foi repetido. A imagem representativa obtida dos camundongos pode ser vista na Figura 4. Os enxertos (setas) podem ser identificados logo abaixo da caixa torácica dos animais, sendo que a imagem superior corresponde ao *baseline* e a inferior, após 60 dias de armazenamento.

**Figura 4 - Imagem Tomográfica de animal imediatamente implantado com fêmur singênico (imagem superior) e após 60 dias de armazenamento (imagem inferior).**



Após cada período de seguimento programado (15, 30 e 60 dias), os radiomarcadores foram injetados para avaliação óssea. Imagens cintilográficas *in vivo* foram adquiridas e, subsequentemente, o fêmur enxertado foi removido, assim como o fêmur controle do animal receptor, para a respectiva quantificação da captação radioativa.

Enxertos não radioativos, e controles homolaterais foram extirpados cirurgicamente no mesmo horário, para análise histológica.

Após 60 dias apenas, como aludido, a tomografia foi realizada, ainda, para comparação com os resultados iniciais.

A Figura 5 mostra o fêmur após 15 dias de armazenamento subcutâneo. O osso estava edemaciado e totalmente recoberto por uma pseudocapsula inflamatória aderente. Tanto a diáfise como as epífises, estavam alargadas. A manipulação do enxerto evidenciou que este havia se tornado mais flexível. Não foi identificada necrose na cortical óssea.

**Figura 5 - Fêmur singênico após 15 dias de implante na bolsa abdominal.**



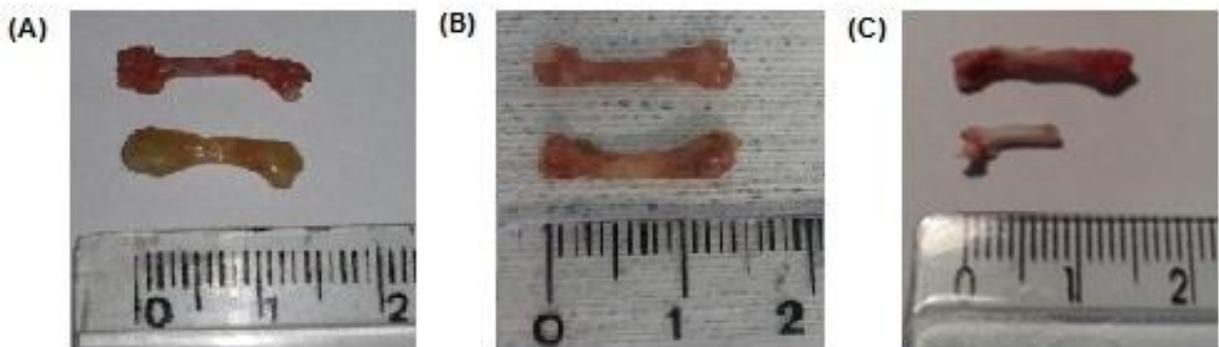
Nessa figura, observa-se ainda que o tecido subcutâneo, onde o osso foi posicionado, apresenta edema e hiperemia, bem como, dilatação dos vasos sanguíneos que podem ser identificados nas proximidades. Essa reação tipo corpo estranho inclui vários capilares sanguíneos.

Após 30 e 60 dias, a reação inflamatória do tecido ao redor do osso continuou, porém com menos hiperemia. O edema ósseo desapareceu e o osso apresentou uma maior fragilidade e reabsorção progressiva.

Em 60 dias a reabsorção óssea e a fragmentação encontravam-se mais evidentes. A mensuração do fragmento enxertado evidenciou redução de aproximadamente 50%, quando comparada com o fêmur controle, em todos os animais.

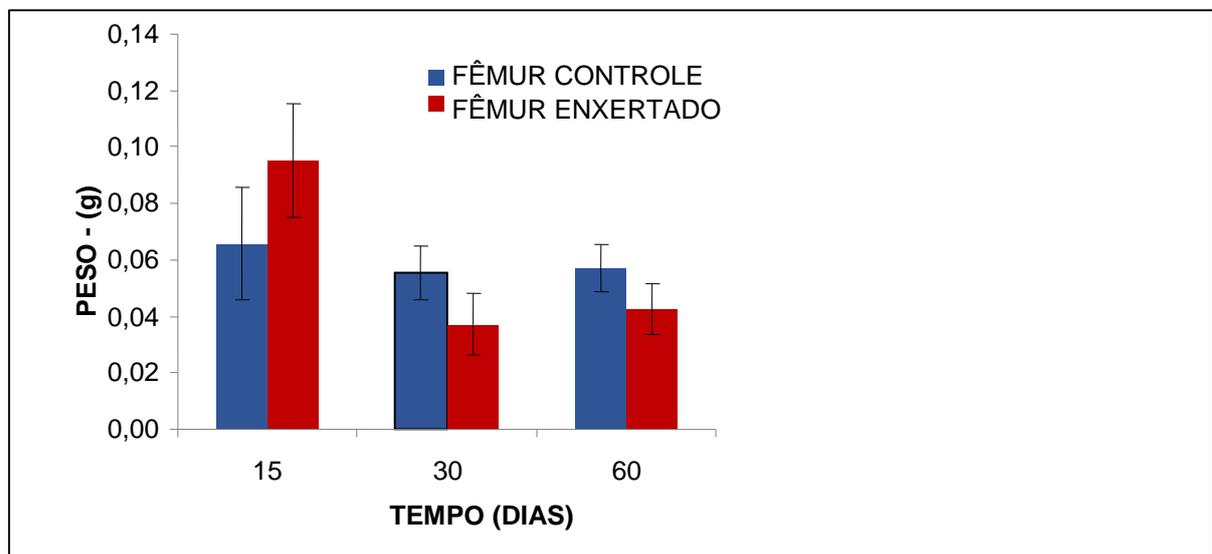
Macroscopicamente, a cortical óssea apresentou aspecto sugestivo de necrose em 30 dias, sendo mais evidente aos 60 dias (Figuras 4 e 6).

**Figura 6 - Fotografias do fêmur controle (imagem superior) e fêmur enxertado (imagem inferior) em momentos diferentes. A: 15 dias, B: 30 dias, C: 60 dias.**



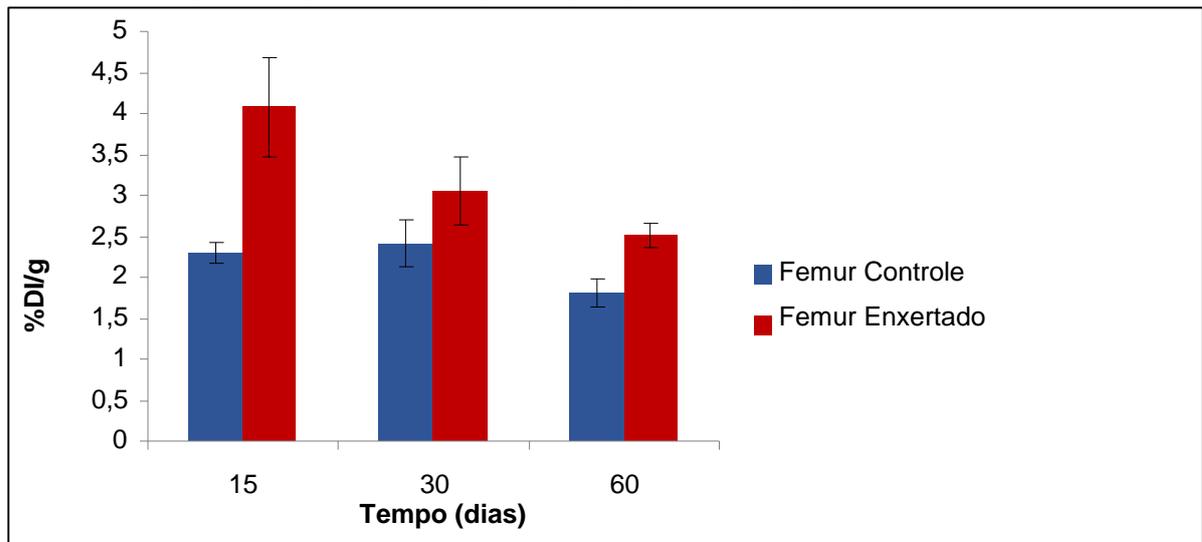
Em relação ao peso dos ossos, observou-se que, após 15 dias, o fêmur enxertado era mais pesado do que o fêmur controle ( $p = 0,038$ ), porém tal perfil foi revertido após 30 e 60 dias de implantação (respectivamente  $p = 0,035$  e  $p = 0,047$ ) (Figura 7).

**Figura 7 - Peso médio de ambos os fêmures – controle e enxertado – dos camundongos após o armazenamento subcutâneo com 15, 30 e 60 dias (intervalo de confiança).**



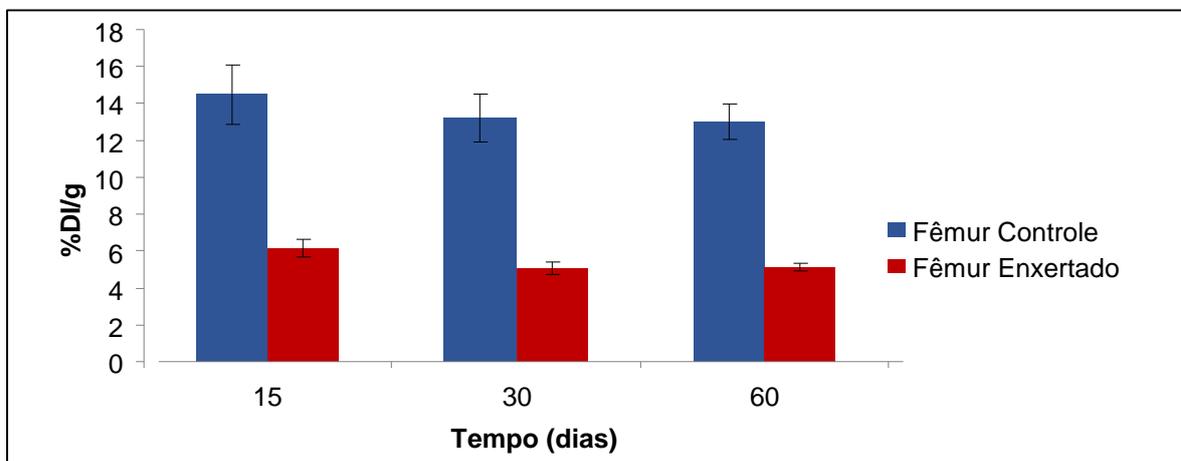
A captação de  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$  para o fêmur controle exibiu algumas flutuações, dependendo do momento em que os animais foram sacrificados. Para o enxerto, a absorção foi maior após 15 dias ( $p = 0,016$ ), subseqüentemente, diminuiu com 30 e 60 dias, respectivamente ( $p = 0,040$  e  $p = 0,043$ ). A absorção do fêmur enxertado foi maior do que o controle, em todas os momentos (Figura 8).

**Figura 8 - Captação média de  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$  em ambos os fêmures – controle e enxertado – dos camundongos após o armazenamento subcutâneo com 15, 30 e 60 dias em porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g) com intervalo de confiança.**



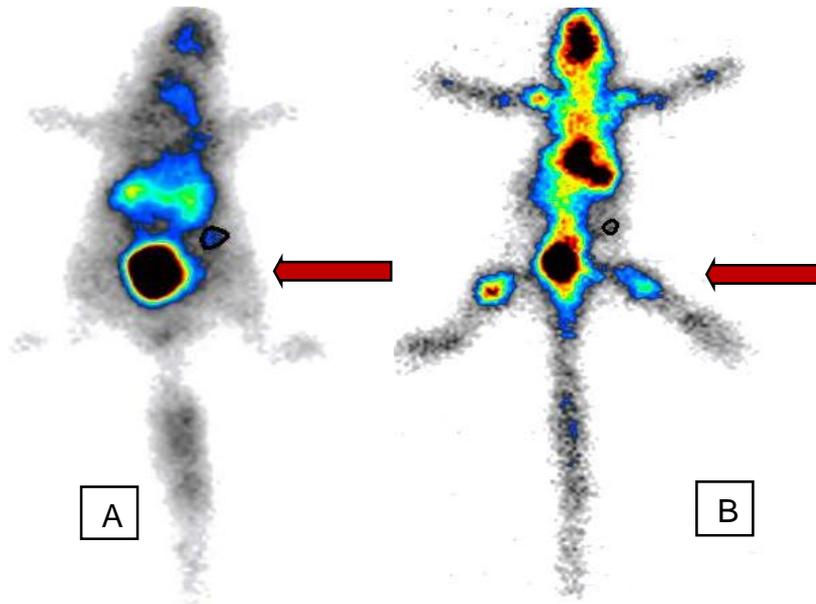
A captação de  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  para o fêmur controle e o implantado foi verificada ao longo de todo o estudo, porém não exibiu grandes variações. O fêmur controle apresentou captação superior ao fragmento enxertado, enquanto que o enxerto evidenciou uma tendência à redução aos 30 e 60 dias (Figura 9).

**Figura 9 - Captação média de  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  em ambos os fêmures – controle e enxertado – dos camundongos após o armazenamento subcutâneo com 15, 30 e 60 dias em porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g) com intervalo de confiança.**



As imagens cintilográficas estáticas obtidas (Figura 10) destacam a absorção de radiomarcadores em todo o corpo, bem como no enxerto singênico do fêmur, após 15 dias de armazenamento.

**Figura 10 - Imagem cintilográfica de camundongos, demonstrando o enxerto de fêmur após 15 dias de armazenamento abdominal. A: captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (ROI = 0,5%) e B: captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (ROI = 0,1%).**

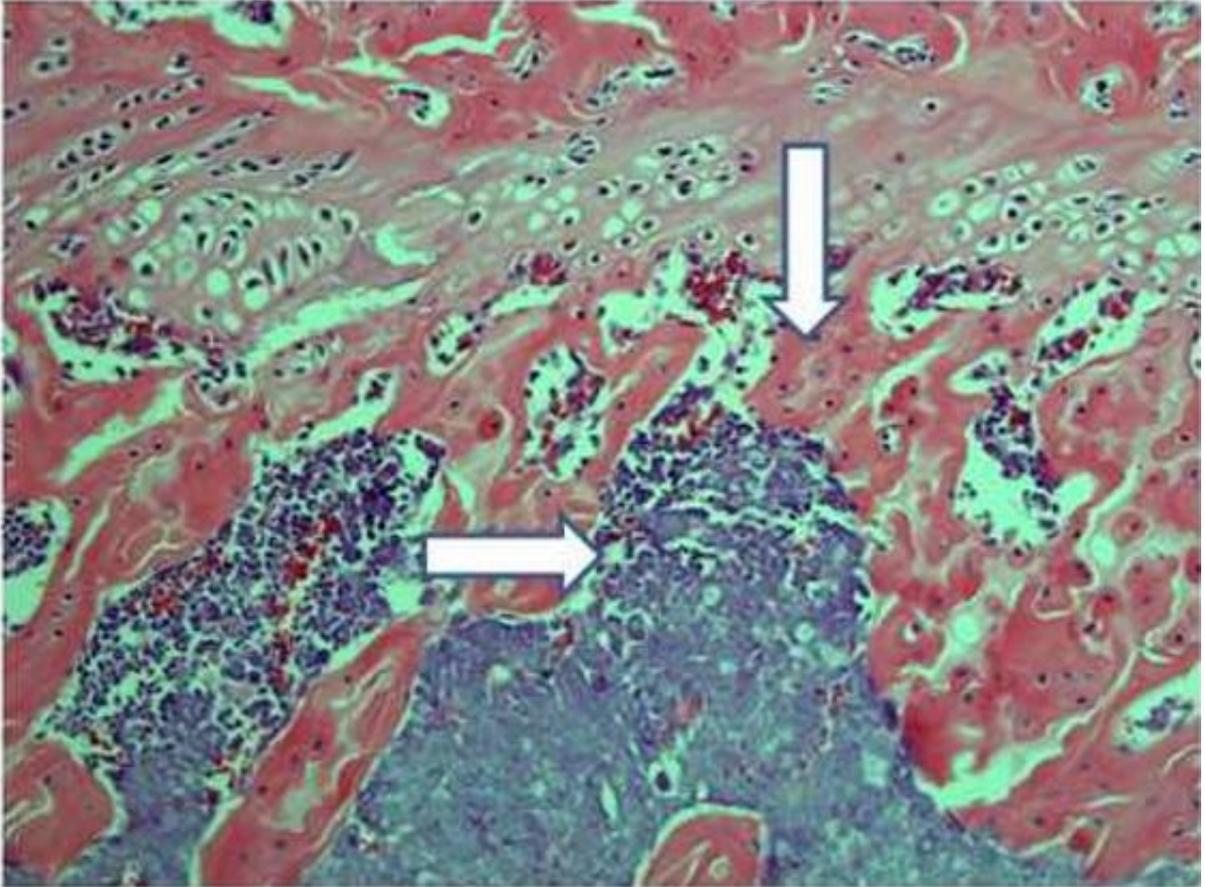


Na imagem ilustrativa A, observa-se a biodistribuição do conjugado  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>. A seta aponta para a região de interesse (ROI), correspondente ao enxerto, com captação ROI = 0,5%.

Já a imagem B evidencia a biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP. A seta aponta para a área de interesse, com captação ROI = 0,1%.

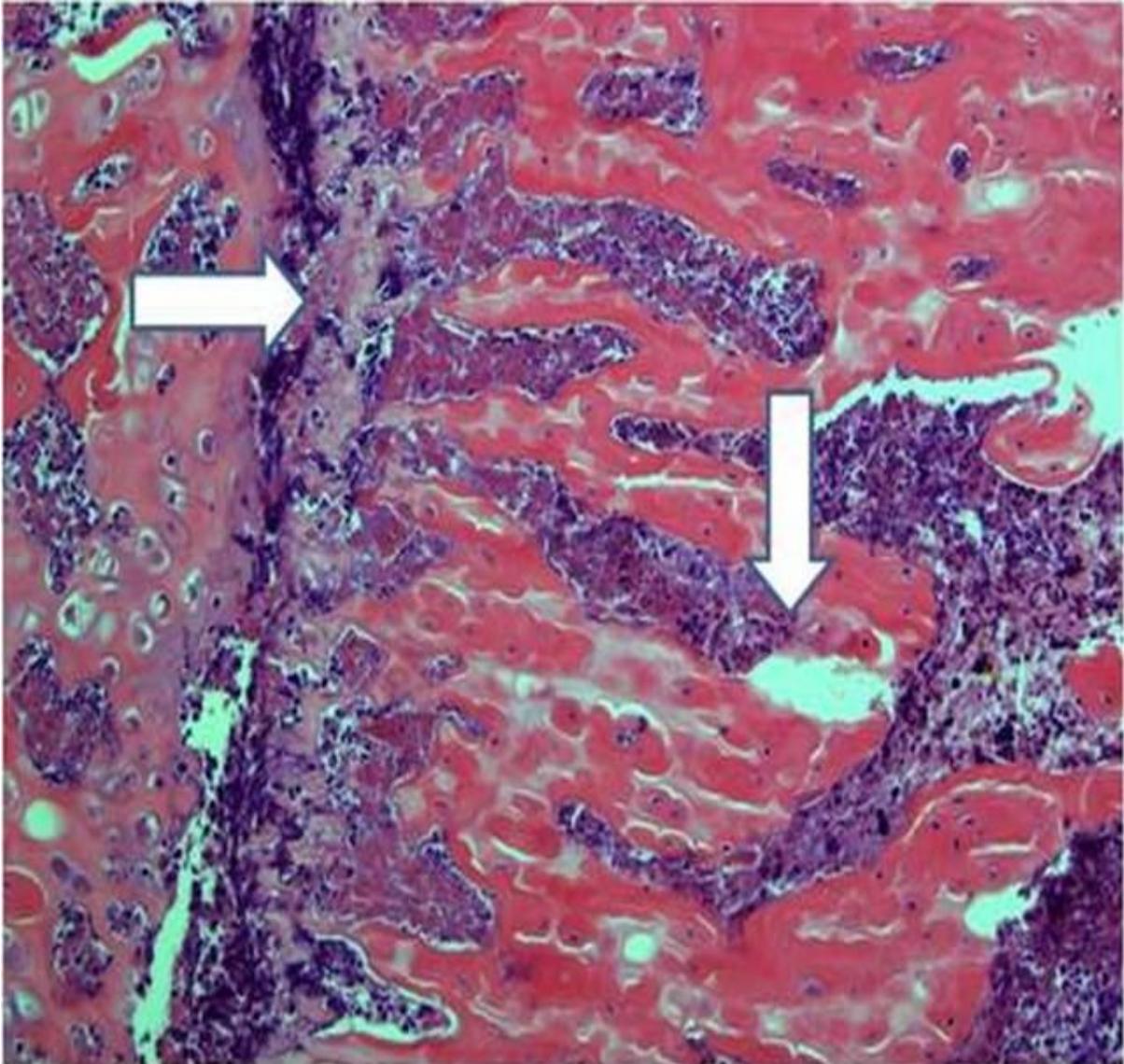
Na imagem abaixo (Figura 11), observa-se um corte histológico do fêmur de um camundongo receptor, corado pela hematoxilina e eosina, evidenciando um trabeculado ósseo saudável, caracterizado por células nucleadas organizadas e medular homogênea.

**Figura 11 - Corte histológico (H & E, 100 X): trabéculas de osso (seta vertical) e medula óssea (seta horizontal).**



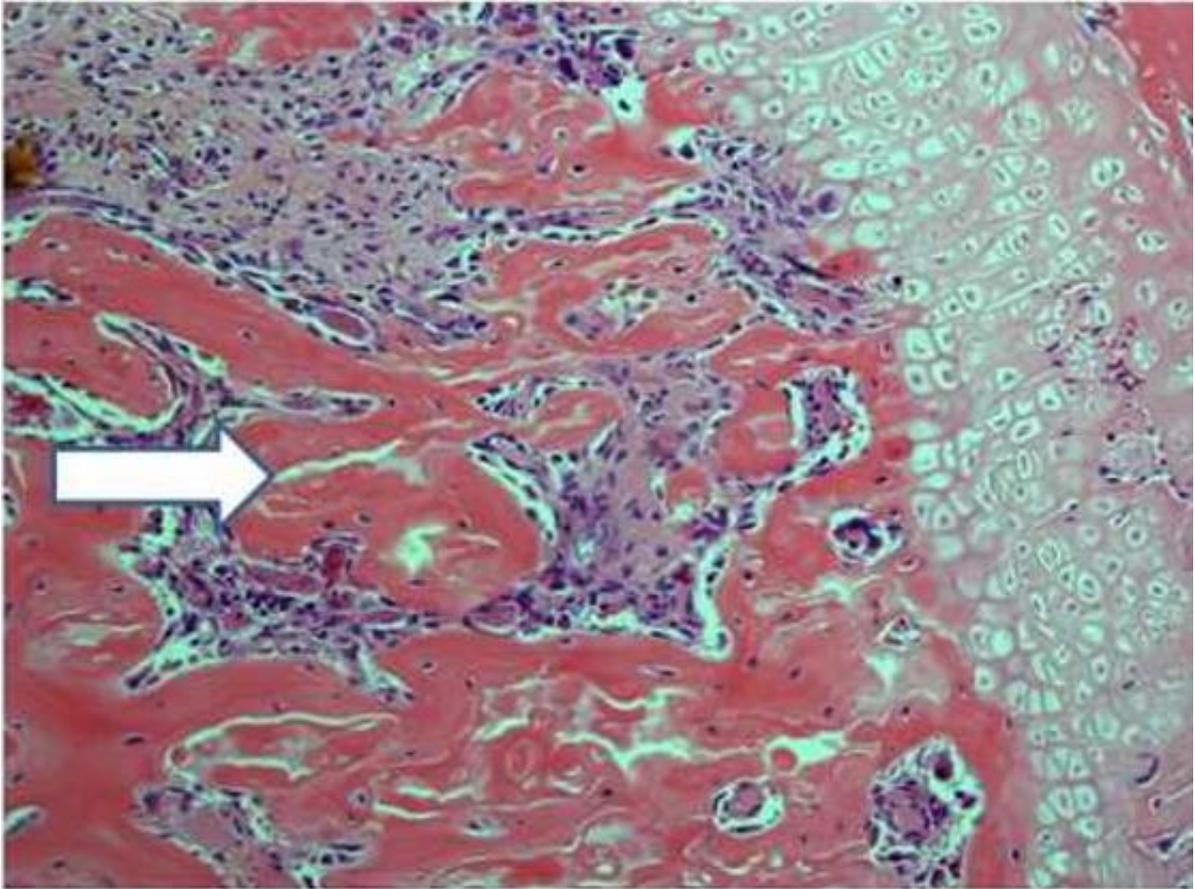
A Figura 12 apresenta corte histológico do fêmur enxertado após 15 dias de evolução. A medula óssea apresenta-se delgada e com focos de necrose (seta horizontal). A seta vertical aponta para áreas de edema. O trabeculado ósseo apresenta sinais de desorganização, formato irregular e células anucleadas.

**Figura 12 - Corte histológico de fêmur enxertado após 15 dias (H & E, 100 X). Medula óssea delgada e com focos de necrose (seta horizontal); Áreas de edema (seta vertical).**



A lâmina abaixo (Figura 13) representa um corte histológico do enxerto ósseo com 30 dias de evolução. O edema não é mais visível e algumas áreas apresentam reabsorção óssea.

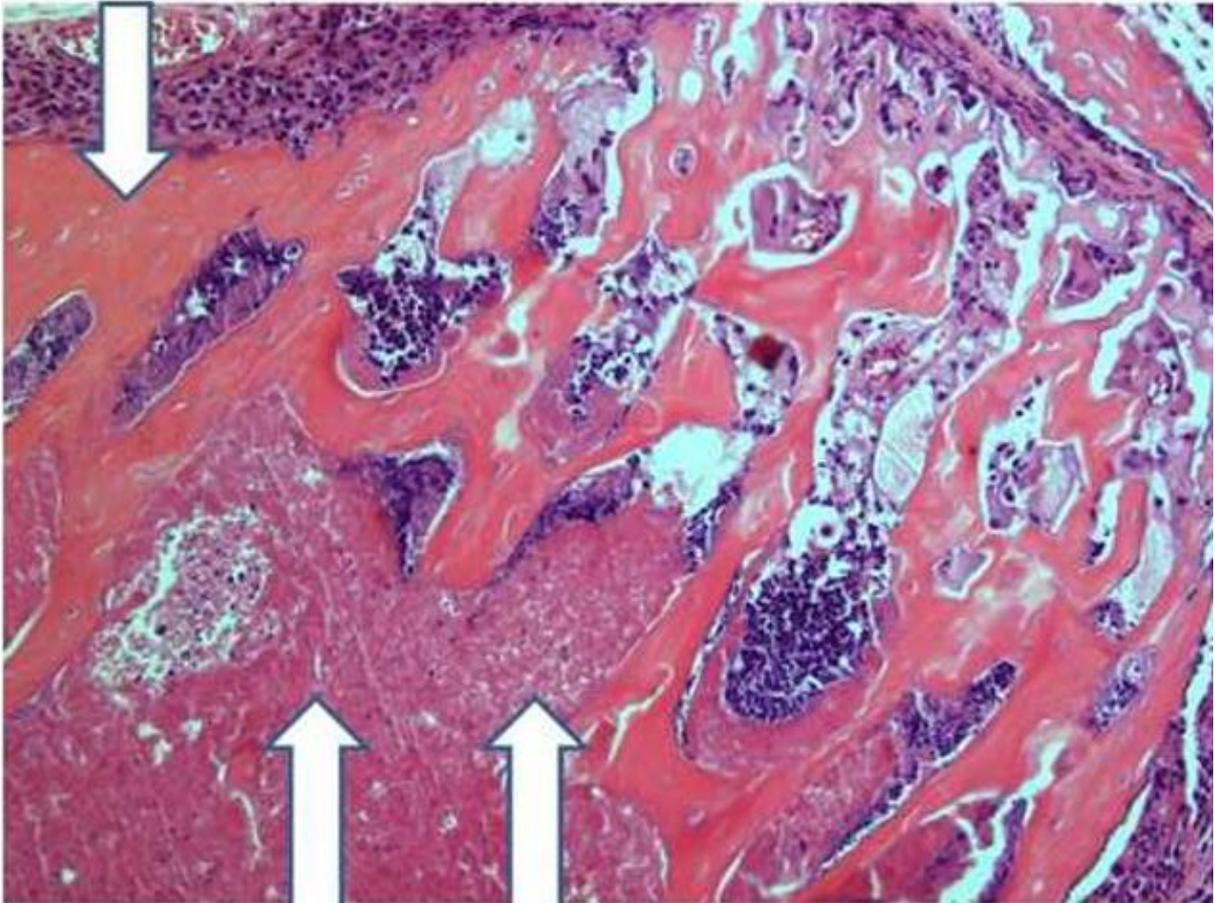
**Figura 13 - Corte histológico do fêmur enxertado após 30 dias (H & E, 100 X). Trabéculas ósseas desorganizadas (seta).**



Trabéculas são menos acentuadas e mais confluentes, consistente com a deterioração óssea progressiva (seta). A histologia da medula óssea varia de necrose em alguns pontos, a quase intacta em outros.

Na lâmina abaixo (Figura 14), após 60 dias de evolução, o enxerto apresenta áreas com extensa destruição de osso (seta para baixo) e de medula óssea (seta dupla para cima). No entanto, como também ocorreu em outros momentos da avaliação histológica, o padrão geral do fêmur implantado foi heterogêneo. Dependendo da localização anatômica visualizada nos cortes, notam-se tanto áreas com osso preservado, histologicamente normal, quanto outras, seriamente danificadas.

**Figura 14 - Corte histológico fêmur enxertado, 60 dias (H & E, 100 X). Destruição óssea (seta para baixo) e medular (dupla seta para cima).**



## 6 DISCUSSÃO

A osteonecrose é uma condição que resulta da perda temporária ou permanente de fornecimento de sangue ao osso, levando à morte de osteócitos, osteoclastos e demais células do osso (FONDI & FRANCHI, 2007).

É um evento frequentemente observado após episódios traumáticos, no curso de radioterapias, no abuso do álcool, na corticoterapia, nas hemoglobinopatias e em diversas outras patologias potencialmente responsáveis por quadros de isquemia óssea. De fato, alguns estudos relataram que este processo inespecífico e de difícil definição parece estar mais relacionado à apoptose do que à necrose (JONES & HUNGERFORD, 2006).

O termo osteonecrose pode ser substituído por quaisquer das denominações que se seguem: necrose avascular, asséptica, isquêmica, subcondral ou subarticular. As duas últimas referem-se à sua tendência para essa desordem afetar as regiões epifisárias dos ossos longos, principalmente a cabeça femoral (ARO & AHO, 1993; FONDI & FRANCHI, 2007; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

Trata-se de uma patologia que pode evoluir assintomaticamente, mas, eventualmente, acarreta um completo colapso da arquitetura do osso e leva à perda da função e incapacidade permanente do segmento acometido (PAVELKA, 2000).

O osso implantado também pode se tornar um sítio de osteonecrose e, quando isso ocorre, sua função de reparar falhas ósseas torna-se comprometida, a menos que, o osso possa se regenerar e se reconstruir espontaneamente ou se recuperar através de uma intervenção cirúrgica (MORINA *et. al.*, 2011).

As ferramentas de diagnóstico clínico para reabsorção óssea não fazem distinção entre eventos caracterizados por mudanças de *turnover* da matriz óssea, apoptose celular e necrose tecidual. Os recursos incluem marcadores bioquímicos tais como: o cálcio urinário, a hidroxiprolina urinária, a fosfatase ácida tartarato-resistente, as moléculas interligadoras do colágeno tipo I, o C-telopeptídeo (CTX) e o N-telopeptídeo urinário (NTX) (DELMAS, 1999; LOOKER *et. al.*, 2000; SIMS & MARTIN, 2014).

Do mesmo modo, a absorciometria de fótons e raios X para a densitometria óssea descrevem os resultados finais de todos os fenômenos de remodelação que ocorrem dentro da massa esquelética, independentemente da sua natureza (BROWN *et. al.*, 2009).

A TC convencional e a RNM podem identificar com precisão alterações anatômicas, como erosão localizada e perda óssea, e podem fornecer pistas sobre zonas necróticas e saudáveis.

No entanto, apenas técnicas mais complexas e especializadas, como micro-TC, micro-RNM e RNM funcional, permitem fazer inferências sobre o metabolismo celular, a progressão da desordem, a cicatrização de tecidos e outros processos funcionais. As informações são limitadas e nenhuma investigação envolvendo imagiologia abordou osteonecrose e angiogênese (WEHRLI, 2007; MORGAN *et. al.*, 2009; SHIGUETOMI *et. al.*, 2012).

No presente protocolo, o diagnóstico da ON e angiogênese foi conduzido por meio de radiotraçadores e CO.

O controle de qualidade dos radiofármacos utilizados no Brasil é realizado exclusivamente pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-TEC) e segue os padrões estabelecidos pela United States Pharmacopeia (USP) e pela European Pharmacopoeia (EP), não estando disponível em clínicas que trabalham com Medicina Nuclear (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001).

Impurezas radioquímicas podem surgir quando de uma radiomarcagem e têm origem na decomposição dos radiofármacos, devido à ação do solvente, temperatura, pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, e radiólise. Elas são consideradas indesejáveis, pois podem expor o indivíduo (e as cobaias utilizadas no presente protocolo) a uma dose extra de radiação desnecessária, bem como, interferir na biodistribuição de radiofármacos (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001). O conceito de pureza radioquímica corresponde ao percentual do radionuclídeo na forma química de interesse em uma determinada amostra radioativa.

Como o ponto de partida para a realização desse protocolo foi a marcação do MDP e do HYNIC-E-c(RGD)<sub>2</sub> com o tecnécio, fez-se necessário proceder ao controle de qualidade dos radiotraçadores obtidos.

O radiofármaco obtido pela marcação do difosfonato de metileno ou ácido medrônico (MDP) com tecnécio (<sup>99m</sup>Tc-MDP) foi submetido a avaliação de pureza radioquímica por meio de papel de filtro para cromatografia e apresentou um grau de pureza de 97,42 ± 0,89% que é considerado elevado pelo IPEN-TEC, demonstrando que a decomposição do radiofármaco, o pH e a presença de quaisquer outras variáveis produziram quantidade mínima de impurezas.

O radiocromatograma do conjugado formado pelo ácido hidrazinonicotinamida (HYNIC), pela sequência peptídica Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD) e tecnécio (<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>) obtido pelo Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), apresentou um pico único aos 14,83 minutos, com pureza radioquímica de 98,85 ± 0,23% (Figura 3), sendo também considerado elevado pelo IPEN-TEC.

O  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP é classicamente utilizado em imagens cintilográficas para avaliação de osso normal e de lesões ósseas por quimiossorção seguida de permuta de cristais de hidroxiapatita com a matriz orgânica do osso (TREMOLDA *et. al.*, 2011 e MAHAJAN; DIGAMBER; SHARMA, 2013). Neste protocolo o radiomarcador foi utilizado tanto em imagens cintilográficas quanto em captação de radiação em contador Gama com a finalidade de avaliar a vitalidade óssea.

O  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> tem sido utilizado para avaliação de neoformação vascular ou angiogênese em processos tumorais, bem como de processos envolvendo osteoclastos – Doença de Paget e Artrite reumatoide (WANG *et. al.*, 2014).

A angiogênese é o processo de formação de neovasos a partir de vasos sanguíneos pré-existent e é amplamente considerado essencial para assegurar o fornecimento de nutrientes e oxigênio aos tecidos isquêmicos (OLIVEIRA *et. al.*, 2012).

Não foram encontrados na literatura relatos anteriores sobre a avaliação direta ou indireta da angiogênese no osso avascular, sendo este protocolo a primeira tentativa de tal avaliação.

A neoformação vascular envolve muitos mediadores, incluindo as integrinas. Os domínios extracelulares de muitas integrinas reconhecem o tripeptídeo RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) encontrado em várias macromoléculas extracelulares, tais como fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e osteopontina (SINGLA *et. al.*, 2014). Esse dado norteou a seleção do  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> como radiotraçador nesse estudo.

Deve notar-se que a integrina  $\alpha\beta3$  é expressa em osteoclastos, que são células que reabsorvem os ossos, e se liga a algumas proteínas contendo RGD, incluindo a osteopontina, abundante no osso. O uso de radiotraçadores RGD foi relatado experimentalmente na forma de PET-CT para a identificação de osteoclastos (ZHELEZNYAK *et. al.*, 2012).

A atividade dos osteoclastos tem sido evidenciada no osso subcondral – a exemplo de cabeças femorais osteonecróticas –, com aumento da expressão de osteoblastos encontrada em áreas vizinhas. A necrose óssea avascular não está listada entre doenças relacionadas com os osteoclastos, mas a sobreposição da angiogênese com a afinidade dos osteoclastos pode interferir na interpretação dos resultados (WANG *et. al.*, 2014). Por esta razão, a confirmação histológica foi procurada para lançar luz sobre as afinidades potencialmente conflitantes de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> neste contexto.

O protocolo utilizou 93 Camundongos Swiss singênicos fêmeas. Essa seleção recaiu sobre elas, pois são mais facilmente encontradas para estudos. A idade de 8 (oito) semanas de vida e o peso de aproximadamente 20g foram definidos para os animais selecionados,

pois permitem um manejo mais fácil e excluem a possibilidade de espécimes que apresentem osteoporose secundária à idade.

O tamanho da amostra não pode ser respaldado em estimativas formais, pois não existem relatos disponíveis na literatura acerca de estudos semelhantes.

Após a introdução do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  em 6 (seis) camundongos e do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$  em mais 6 (seis) camundongos (12 animais, no total), a radioatividade foi medida em contador Gama e expressa em porcentagem da dose por grama, sendo a biodistribuição nos diversos tecidos e órgãos registrada na Tabela 4.

Com a fixação seletiva dos radiomarcadores, observou-se adequada depuração sanguínea. O  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ , por ser mais hidrófilo, apresentou uma excreção renal mais acentuada que o  $^{99m}\text{Tc-MDP}$ . Evidenciou-se também excreção hepatointestinal para os radiotraçadores, porém para o  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  apresentou excreção hepática e concentração entérica mais baixa. As captações pelo baço foram semelhantes. O  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  exibiu muito mais afinidade para o osso do que o  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ , tal como esperado (OLIVEIRA *et. al.*, 2006).

Esse procedimento inicial foi necessário, para se obter uma biodistribuição padrão de radiotraçadores em camundongos Swiss sadios, com a finalidade de servir de parâmetro para os níveis de radiação encontrados nos Grupos 1 e 2 da amostra.

Vinte e sete camundongos foram utilizados como doadores de fêmures para outros 54 animais receptores. A escolha recaiu sobre esse grande osso do esqueleto apendicular da cobaia pelas suas dimensões e acessibilidade, permitindo a monitorização detalhada, mediante distintos métodos diagnósticos por imagem (TC e CO), pela captação da radioatividade em contador Gama e também por histologia.

Note-se que o fragmento ósseo selecionado – fêmur (mesmo que não a cabeça femoral) – foi escolhido por representar o sítio onde a ON é mais frequentemente observada e descrita na literatura (JACOBS,1978; ARO & AHO,1993; SEAMON *et. al.*, 2012; MOYA-ANGELER *et. al.*, 2015).

O sítio escolhido para alojar o fragmento ósseo doado foi uma bolsa criada cirurgicamente na região subcutânea abdominal do animal receptor. Essa técnica de abrigar um enxerto ósseo nessa localização data de um caso descrito em 1920 e, mais recentemente, foi reproduzida por Shoakazemi *et. al.*, 2009 em 100 pacientes com hipertensão craneana e por Morina *et. al.*, 2011 em 75 vítimas de guerra em Kosovo. A enxertíase óssea humana por essa

técnica foi considerada segura, fácil, barata, estéril, histocompatível e atingiu um melhor resultado cosmético após a recolocação do fragmento ósseo, o mais precocemente possível, em seu sítio de origem por esses pesquisadores (KREIDER, 1920; FALEIRO *et. al.*, 2005; SHOAKAZEMI; FLANNERY; McCONNELL, 2009 e MORINA *et. al.*, 2011).

Em função do sucesso apresentado por esses trabalhos e o uso atual dessa técnica, rotineiramente na Neurologia, em cirúrgicas de descompressão craneana, houve o interesse de replica-la em modelos animais experimentais, porém com a manutenção do enxerto ósseo por um tempo superior ao descrito naqueles trabalhos.

O presente protocolo objetivou a observação do comportamento dos fêmures singênicos doados, não sendo contemplados procedimentos terapêuticos, apenas diagnósticos e evolutivos, dado o tempo requerido para o aprimoramento do modelo animal proposto e a confirmação do quadro patológico induzido.

Outro dado importante é que os 54 animais receptores passaram a apresentar um total de 3 (três) fêmures: dois ortotópicos e um singênico, portanto cada animal apresentava o equivalente a três fêmures próprios. A manutenção da mobilidade dos animais fazia parte dos requisitos, a fim de minimizar a mortalidade a longo prazo, comumente desencadeada pela imobilização parcial ou total. Assim, a ON foi induzida no fêmur singênico enxertado, em animais que se encontravam em perfeito estado de saúde, após o ato cirúrgico.

No pós-operatório imediato, foi utilizada a oxacilina para antibioticoprofilaxia por via oral durante 5 (cinco) dias. Esse antibiótico  $\beta$ -lactâmico tem sido usado no tratamento de infecções pulmonares, ósseas, de ouvido, pele e trato urinário em humanos, demonstrando eficácia, boa tolerância, segurança e bom custo-benefício, características levadas em conta quando da sua administração profilática nos animais receptores do fêmur singênico (WU *et. al.*, 2015).

Realizou-se uma busca computadorizada pela literatura que trata de modelos animais experimentais de ON, utilizando a base de dados PubMed com limite de tempo igual a 10 (dez) anos; com os filtros *review* e *full text* e termos de busca: “*animal models*” e “*osteonecrosis*”, o que resultou em 27 artigos. Desses, selecionamos os trabalhos relevantes ao tema, restando apenas 1 (um): *Experimental animal models of osteonecrosis* escrito por Fan *et. al.*, 2011.

Nessa revisão, não foram encontradas quaisquer referências a um modelo animal experimental de ON semelhante ao utilizado no presente trabalho, configurando-se, assim, o ineditismo do modelo animal criado.

Após a implantação dos fêmures singênicos nos animais receptores do Grupo 3 – tempo considerado como *baseline* –, foi realizada a TC, exame adequado para a avaliação mais precisa dos contornos anatômicos do osso, cuja imagem demonstrou a presença do fêmur enxertado de tamanho original, abaixo da caixa torácica. Outras imagens foram realizadas em momentos distintos do *baseline*, no entanto a que denotou alteração mais significativa ocorreu aos 60 dias do implante, demonstrando que cerca de 50% do enxerto havia sido absorvido (Figura 4 e Figura 6 C).

Os animais do Grupo 3 também foram sacrificados para obtenção da fotografia do fêmur singênico após 15 dias de implante na bolsa abdominal. Note-se que, apesar de se tratar de um fragmento ósseo singênico, o animal receptor desenvolveu processo inflamatório tipo corpo estranho semelhante àquela descrita por Hobar e Byrd (1990) nas 9 (nove) etapas do processo de incorporação do enxerto ósseo. Vale a pena salientar que nessa descrição, o enxerto ósseo foi colocado numa falha óssea objetivando sua reparação e no presente trabalho fragmento encontra-se em região ectópica de partes moles.

Os dados obtidos com 15 dias – reação inflamatória macroscópica do fragmento ósseo implantado em bolsa abdominal do camundongo (Figura 5); aspecto edemaciado macroscópico do fêmur enxertado (Figura 6 A) e peso médio aumentado ( $p = 0,038$ ) dos fêmures enxertados (Figura 7) – sugeriam uma reação inflamatória tipo corpo estranho, porém com a captação radioativa média elevada ( $p = 0,016$ ) de  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDFK)]}_2$  (Figura 8); captação radioativa média presente de  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  (Figura 9), e a imagem cintilográfica que demonstra a captação de ambos os radiomarcadores (Figura 10 A e B) sugerem a presença de angiogênese e vitalidade do fragmento ósseo enxertado, mesmo estando ele avascularizado.

O peso médio dos fêmures enxertados avaliados com 15, 30 e 60 dias, quando comparados entre si (Figura 7), evidencia uma redução progressiva denotando uma tendência a reabsorção, ratificada pelas imagens da Figura 6A, B e C.

A captação média de radiação do  $^{99m}\text{Tc-HYNIC-E-[c(RGDFK)]}_2$  dos fêmures enxertados com 15, 30 e 60 dias (Figura 8) demonstra a presença significativa de angiogênese em todos os tempos, mesmo com a tendência à redução progressiva na linha de tempo, por causa da ectopia, que não favorece a osteocondução e a migração de osteoblastos do hospedeiro (HERNIGOU *et. al.*, 2008).

Comparada à dos os fêmures controles, a captação mostra-se sempre maior em todos os momentos, (figura 9), sugerindo que os fêmures controles estão com sua vascularização normal, enquanto os enxertados estão em processo ativo de neovascularização.

A captação média da radiação do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP dos fêmures enxertados comparados aos controles com 15, 30, e 60 dias (Figura 9) mostra-se menor, porém sempre presente, denotando que o osso enxertado, mesmo desvitalizado e ectópico, permanece viável.

O aumento da angiogênese evidenciado principalmente nos 30 primeiros dias (sugerido pela curva de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDFK)]<sub>2</sub>) pode ser responsável pela viabilidade óssea no mesmo período (sugerida pela captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP), apesar da isquemia.

A análise morfofuncional dos tecidos – histologia e histopatologia do tecido ósseo – é uma técnica doença-específica, precisa e confiável. Ela identifica claramente o envolvimento da matriz óssea e várias linhagens celulares em evolução. Essa ferramenta foi usada aqui para fins de confirmação diagnóstica. No entanto, suas aplicações clínicas são restritas, pois essa análise é um procedimento altamente invasivo, dispendioso e demorado (SINGLA *et. al.*, 2014 e RENTSCH *et. al.*, 2014).

A geração de osso novo foi ocasionalmente detectada em lâminas histológicas nesse trabalho, no entanto o dano da medula óssea se constituiu na característica mais notável. Deve-se enfatizar a heterogeneidade dos resultados, que não foi percebida nas figuras do trabalho referentes à histologia (Figuras 12,13 e 14), pois se tratam de imagens representativas.

Em todos os *follow-ups*, mas especificamente após 30 e 60 dias, áreas saudáveis coexistiam com tecido esquelético comprometido. Esse achado pode ser considerado uma limitação do monitoramento histológico da ON dos fêmures enxertados, já que a interpretação do material das biópsias se tornou dependente das flutuações topográficas do dano tecidual.

A mesma heterogeneidade morfológica impediu as correlações ponto-a-ponto entre os perfis da histologia e do radiotraçador. Dessa forma, não foi possível uma associação comprobatória entre os momentos de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDFK)]<sub>2</sub> com o que era visualizado na histologia – angiogênese, nova síntese óssea e reabsorção osteoclástica.

Porém, a tendência para a deterioração progressiva da histologia do fêmur de 15 para 60 dias, foi totalmente compatível com resultados da captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP, que é um marcador de saúde óssea não específico.

Há razões para acreditar que células periostais, endostais e medulares localizadas acerca de 0,2 mm da superfície óssea consigam sobreviver após a excisão do implante ósseo, enquanto

as demais localizadas abaixo dessa camada sucumbem (SHOAKAZEMI, A; FLANNERY, T; McCONNELL, 2009 e RITTER *et. al.*, 2014).

Como o tecido subcutâneo é anatomicamente um leito mal vascularizado e ocorre uma demora de alguns dias ou semanas para o aparecimento da reação inflamatória circundante à bolsa e da angiogênese do enxerto, a morte celular pode ser inevitável, prejudicando, potencialmente, a viabilidade futura do enxerto.

O protocolo foi bem-sucedido e um modelo animal experimental simples, estável e conveniente foi criado.

Ao mesmo tempo, os dois radiotraçadores provaram ser fáceis de empregar e os resultados foram encorajadores. Mesmo em tecido totalmente isquêmico, desprovido de qualquer fluxo sanguíneo, ambos foram claramente captados e puderam ser identificados por imagem.

Eles são agentes relativamente baratos e disponíveis, pelo menos em instituições com acesso a instalações de Medicina Nuclear.

O tecnécio tem uma meia-vida química de 6 horas e uma meia-vida biológica de 24 horas, permitindo até avaliações semanais sucessivas com segurança, se clinicamente indicadas.

Os radiotraçadores merecem investigação em enxertos ósseos e doença óssea isquêmica, dentre outros cenários, não só nos casos de preservação abdominal de enxertos de abóbada craniana com o objetivo de expandir os achados atuais, mas também desvendar os processos biomoleculares específicos ligados ao início, progressão e resolução de eventos necróticos.

## 7 CONCLUSÕES

Foi criado um novo modelo experimental de osteonecrose óssea em animais móveis, tornando o estudo conveniente e prático, mesmo para períodos de seguimento relativamente longos.

O diagnóstico de condições do enxerto por radiotraçadores sistêmicos foi demonstrado pela primeira vez em uma estrutura óssea totalmente desvascularizada, abrindo caminhos para estudos futuros.

A especificidade dos radiotraçadores para vitalidade óssea e angiogênese, pode representar uma vantagem para o diagnóstico precoce e confiável das condições biológicas do enxerto, em comparação com ferramentas mais tradicionais, todavia inespecíficas, incluindo a tomografia computadorizada e a ressonância magnética.

A avaliação funcional do osso por meio de radiotraçadores, processo não invasivo, apresentou vantagens tanto sobre a biópsia de osso necrótico, cuja heterogeneidade histológica dificulta a determinação do diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

ALBEE, F. H. Bone-graft surgery. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 324, p. 5-12, 1996.

ALENCAR, P. G. C; VIEIRA, I. F. V. Banco de ossos. **Rev. bras. ortop**, v. 45, n. 6, p. 524-28, 2010.

ALVES, Pedro Luz *et. al.* Brazilian spine surgeon profile. **Coluna/Columna**, v. 12, n. 3, p. 218-23, 2013.

AMANATULLAH, D. F; STRAUSS, E. J.; DI CESARE, P. E. Current management options for osteonecrosis of the femoral head: part 1, diagnosis and nonoperative management. **Am j orthop (Belle Mead NJ)**, v. 40, n. 9, p. E186-92, 2011.

ANDIA, D. C; CERRI, P. S; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.

ARO, H. T.; AHO, A. J. Clinical use of bone allografts. **Annals of medicine**, v. 25, n. 4, p. 403-12, 1993.

AXHAUSEN, G. Histologische Untersuchungen über Knochentransplantation am Menschen. **Dtsch z chir**, v. 91, p. 388, 1907.

BANERJEE, S. R. *et. al.* New directions in the coordination chemistry of <sup>99m</sup>Tc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nuclear medicine and biology**, v. 32, n. 1, p. 1-20, 2005.

BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. In: **Seminars in nuclear medicine**. WB Saunders, p. 260-77, 2001.

BAPTISTA, A. D. *et. al.* A histological study of human allografts. **Acta Ortopédica brasileira**, v. 11, n. 4, p. 220-4, 2003.

BARTH, Arthur. **Ueber histologische befunde nach knochenimplantationen**. German: [s.n.], 1893.

BARTHOLOMÄ, M. D. *et. al.* Technetium and gallium derived radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era. **Chemical reviews**, v. 110, n. 5, p. 2903-20, 2010.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 371, p. 10-27, 2000.

BENADIBA, M. *et. al.* New molecular targets for PET and SPECT imaging in neurodegenerative diseases. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 34, p. s125-s148, 2012.

BLANCO, A. C; MÁRTINEZ-LÁZARO, R. Condiciones autorizadas de uso humano en la práctica clínica de los generadores de molibdeno-99/tecnecio-99m comercializados en España. **Seguridad nuclear: Revista del CSN**, n. 39, p. 13-20, 2006.

BOETTCHER, WILLIAM G. *et. al.* Non-Traumatic Necrosis of the Femoral Head I. Relation of altered hemostasis to etiology. **J Bone Joint Surg Am**, v. 52, n. 2, p. 312-21, 1970.

BROWN JACQUES. P. *et. al.* Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. **Clin Biochem**, v. 42, n. 10, p. 929-42, 2009.

BÜRING, K; URIST, M. R. Transfilter bone induction. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 54, p. 235-42, 1967.

CATTO, M. A histological study of avascular necrosis of the femoral head after transcervical fracture. **J Bone joint surg Br**, v. 47, n. 4, p. 749-76, 1965.

CHANDLER, F. A. Coronary disease of the hip. **Journal of international college of surgeons**, v. 11, n. 1, p. 34-36, 1948.

CHENG, Hongwei *et. al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **J bone joint surg Am**, v. 85, n. 8, p. 1544-52, 2003.

COOPER, C. *et. al.* "The Epidemiology of Osteonecrosis: Findings from the GPRD and THIN Databases in the UK." **Osteoporosis international** v. 21, n. 4, p. 569-77, 2010.

CORDERO-AMPUERO, J. Girdlestone procedure: when and why. **Hip international**, 2012.

DECRISTOFORO, C.; MATHER, S. J. 99m-Techetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. **Nuclear medicine and biology**, v. 26, n. 4, p. 389-96, 1999.

DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover in Paget's disease of bone. **J bone miner res**, v. 14, n. S2, p. 66-9, 1999.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature reviews cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.

DIJKGRAAF, I. *et. al.* Improved targeting of the  $\alpha v \beta 3$  integrin by multimerisation of RGD peptides. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 34, n. 2, p. 267-73, 2007.

DOBRUCKI, L. W.; SINUSA A.J.; Imaging angiogenesis **Curr. opin. biotechnol**, v.18, p.90-6, 2007

EBENHAN, T. *et. al.* Peptide synthesis, characterization and  $^{68}\text{Ga}$ -radiolabeling of NOTA-conjugated ubiquitin fragments for prospective infection imaging with PET/CT. **Nuclear medicine and biology**, v. 41, n. 5, p. 390-400, 2014.

ENNEKING, W. F. *et. al.* Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. **J bone joint surg Am**, v. 57, n. 2, p. 237-52, 1975.

FAINTUCH, B. L. *et. al.*  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Bombesin (7-14) NH<sub>2</sub>: Radiochemical Evaluation with Co-ligands EDDA (EDDA= Ethylenediamine-N, N'-diacetic Acid), Tricine, and Nicotinic Acid. **Synthesis and reactivity in inorganic, metal-organic and nano-metal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 43-51, 2005.

FAINTUCH, B. L. *et. al.* Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. **Nuclear medicine and biology**, v. 35, n. 4, p. 401-11, 2008.

FALEIRO, R. M. *et. al.* Craniotomia descompressiva para tratamento precoce da hipertensão intracraniana traumática. **Arq neuropsiquiatr**, v. 63, n. 2-B, p. 508-13, 2005.

FAN, M.*et. al.* Experimental animal models of osteonecrosis. **Rheumatology international**, v. 31, n. 8, p. 983-94, 2011.

FAZILI, M. *et. al.* Follow-up investigation of reconstruction of the alveolar process in the atrophic mandible. **International journal of oral surgery**, v. 7, n. 4, p. 400-4, 1978.

FONDI, C.; FRANCHI, A. Definition of bone necrosis by the pathologist. **Clinical cases in mineral and bone metabolism**, v. 4, n. 1, p. 21, 2007.

FRIEDLANDER, G. E. Current concepts review: Bone grafts. **J bone joint surg**, v. 69, p. 786, 1987.

FU, P. *et. al.* Molecular imaging of MDM2 messenger RNA with 99mTc-labeled antisense oligonucleotides in experimental human breast cancer xenografts. **Journal of nuclear medicine**, v. 51, n. 11, p. 1805-12, 2010.

GASBARRA, E. *et. al.* Conservative surgery for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: current options. **Clinical cases in mineral and bone metabolism**, v. 12, n. Suppl 1, p. 43, 2015.

GERBER, H. P. *et. al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 623-8, 1999.

9

GLOWACKI, J. Angiogenesis in fracture repair. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 355, p. S82-S89, 1998.

GLUECK, C. J. *et. al.* Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 386, p. 19-33, 2001.

GOLDBERG, V. M. *et. al.* Biological and physical properties of autogenous vascularized fibular grafts in dogs. **J bone joint surg Am**, v. 72, n. 6, p. 801-10, 1990.

GONZÁLEZ, P. *et. al.* Artículo de revisión Aplicaciones clínicas del PET. **Revista médica de Chile**, v. 130, n. 5, maio 2002.

GOSAIN A. K.; Bioactive glass for bone replacement in craniomaxillofacial reconstruction. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 2, p. 590-93, 2004.

GOSLING-GARDENIERS, A. C.; RIJNEN, W. H. C.; GARDENIERS, J. W. M. The Prevalence of Osteonecrosis in Different Parts of the World. In: KOO, Kyung-Hoi; MONT, Michael A.; JONES, Lynne C. **Osteonecrosis**. Heidelberg: Springer Berlin, p. 35-7, 2014.

GUARNIERO, R; ANDRUSAITIS, F. R; BRECH, G. C.. Classificação e tratamento fisioterapêutico da doença de Legg-Calvé-Pertkes: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 12, n. 2, p. 51-7, 2005.

HANNOUCHE, D. *et. al.* Thirty years of experience with alumina-on-alumina bearings in total hip arthroplasty. **International orthopaedics**, v. 35, n. 2, p. 207-13, 2011.

HARAKAS, N. K. Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 188, p. 239-251, 1984.

HERNÁNDEZ FALCÓN, D.; MARRERO RIVERÓN, L. O.; LEDEA LOZANO, O. E. Empleo de la medicina nuclear y las técnicas de imágenes en las afecciones del sistema óseo. **Revista Cubana de ortopedia y traumatología**, v. 26, n. 2, p. 190-212, 2012.

HERNIGOU, P. *et. al.* Bone marrow injection in hip osteonecrosis. **Techniques in orthopaedics**, v. 23, n. 1, p. 18-25, 2008.

HERNIGOU, P. *et. al.* Morbidity of graft harvesting versus bone marrow aspiration in cell regenerative therapy. **International orthopaedics**, v. 38, n. 9, p. 1855-1860, 2014.

HNATOWICH, D. J. *et. al.* Technetium-99m labeling of DNA oligonucleotides. **Journal of nuclear medicine**, v. 36, n. 12, p. 2306-14, 1995.

HOBAR, P. C.; BYRD, H. S. Implantation: bone, cartilage and alloplasts (overview). **Select read plast surg**, v. 6, n. 11, p. 1-28, 1990.

HU, Ning *et. al.* BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. **J cell Sci**, v. 126, n. 2, p. 532-41, 2013.

INOUE, A. *et. al.* The pathogenesis of Perthes' disease. **Journal of bone & joint surgery, british volume**, v. 58, n. 4, p. 453-61, 1976.

JACOBS, B. Epidemiology of traumatic and nontraumatic osteonecrosis. **Clinical Orthopaedics and related research**, v. 130, p. 51-67, 1978.

JOHNSON, R. W. A physiological study of the blood supply of the diaphysis. **J Bone joint surg Am**, v. 9, n. 1, p. 153-84, 1927.

JONES JR, J. P. Concepts of etiology and early patogenesis of osteonecrosis. **Instr course lect**, v. 43, p. 499-512, 1994.

JONES, L. C.; HUNGERFORD, D. S. The pathogenesis of osteonecrosis. **Instructional course lectures**, v. 56, p. 179-96, 2006.

JURISSON, S. S.; LYDON, J. D. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. **Chemical reviews**, v. 99, n. 9, p. 2205-18, 1999.

KASTE, S. C. *et. al.* Utility of Early Screening Magnetic Resonance Imaging for Extensive Hip Osteonecrosis in Pediatric Patients Treated With Glucocorticoids. **Journal of clinical oncology**, v. 33, p. 610-15, 2015.

KATTAPURAM, T. M.; KATTAPURAM, S. V. Spontaneous osteonecrosis of the knee. **European journal of radiology**, v. 67, n. 1, p. 42-8, 2008.

KERRY, R. M. *et. al.* The biology of bone grafting. **Instructional course lectures**, v. 48, p. 645-52, 1998.

KHAN, S. N. *et. al.* The biology of bone grafting. **Journal of the American Academy of orthopaedic surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

KINI, U; NANDEESH, B. N. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In: **Radionuclide and hybrid bone imaging**. Springer Berlin Heidelberg, p. 29-57, 2012.

KOPECKY, M. *et. al.* Analysis of accumulation of 99m Tc-octreotide and 99m Tc-EDDA/HYNIC-Tyr 3-octreotide in the rat kidneys. **Nuclear medicine and biology**, v. 31, n. 2, p. 231-39, 2004.

KREIDER, G.N. Repair of cranial defect by new method: report of apparently successful case. **Journal of the american medical association**, v. 74, n. 15, p. 1024-24, 1920.

LAING, P. G. The blood supply of the femoral shaft. **J bone joint surg br.** v. 35, p. 462-66, 1953.

LAING, P. G. The arterial supply of the adult humerus. **J bone joint surg am**, v. 38, n. 5, p. 1105-16, 1956.

LAREDO FILHO, J. *et. al.* Importância da tomografia computadorizada na necrose asséptica da cabeça femoral: proposta de uma classificação. **Rev. bras. ortop**, v. 25, n. 3, p. 55-62, 1990.

LIU, S. *et. al.* Coligand effects on the solution stability, biodistribution and metabolism of the 99m Tc-labeled cyclic RGDfK tetramer. **Nuclear medicine and biology**, v. 35, n. 1, p. 111-21, 2008.

LOOKER, A. C. *et. al.* Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions. **Osteoporosis international**, v. 11, n. 6, p. 467-80, 2000.

LOPEZ-CURTO, J. A.; BASSINGTHWAIGHTE, J. B.; KELLY, P. J. Anatomy of the microvasculature of the tibial diaphysis of the adult dog. **J Bone joint surg Am**, v. 62, n. 8, p. 1362-69, 1980.

MACEDO, C. A. S; GALIA, C. R. Fraturas e Luxações do Quadril no Adulto. In: HEBERT, S.; XAVIER, R. **Ortopedia e traumatologia**: princípios e prática. Porto Alegre: Artmed, p. 1238-51, 2003.

MACNAB, I. The blood supply of tubular and cancellous bone. **Journal bone joint surgery inc** v. 40, n. 6, 1958.

MAHAJAN, M.S; DIGAMBER, N.S; SHARMA, R. Technetium-99m-methylene Diphosphonate Uptake in Hepatic Necrosis Secondary to Respiratory Failure. **World journal of nuclear medicine**, v. 12, n. 3, p. 116, 2013.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiol bras**, v. 34, n. 4, p. 233-39, 2001.

MCCARTHY, E F. Aseptic Necrosis of Bone: An Historic Perspective. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 168, p. 216-21, 1982.

MESZAROS, L. K. *et. al.* Synthesis and evaluation of analogues of HYNIC as bifunctional chelators for technetium. **Dalton transactions**, v. 40, n. 23, p. 6260-7, 2011.

MILORI, F. P. *et. al.* Bone plates produced from equine cortical bone in rabbits femoral osteosynthesis. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1201-7, 2013.

MORGAN, E.F. *et. al.* Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 335-44, 2009.

MORINA, A. *et. al.* Cranioplasty with subcutaneously preserved autologous bone grafts in abdominal wall—Experience with 75 cases in a post-war country Kosova. **Surgical neurology international**, v. 2, n.4, 2011.

MOYA-ANGELER, J.; GIANAKOS, A.L.; VILLA, J. C.; NI, A.; LANE, J. M. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. **World journal of orthopedics**, v. 6, n.º. 8, p. 590-601, 2015.

MOWLEM, R. Cancellous chip bone-grafts report on 75 cases. **The lancet**, v. 244, n. 6328, p. 746-48, 1944.

MUGLIA, V. F. *et. al.* Erros comuns de interpretação de ressonância magnética de joelho: como reconhecê-los e evitá-los. **Radiologia brasileira**, v. 34, n. 3, p. 161-66, 2001.

MULLIKEN, B. D. Osteonecrosis of the femoral head: current concepts and controversies. **The Iowa orthopaedic journal**, v.13 p.160-66, 1993.

NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. **Archives of oral biology**, v. 35, n. 7, p. 493-97, 1990.

NEVES, J. *et. al.* Método de Papineau Uma opção válida no tratamento da osteomielite e/ou pseudartrose infectada. **Revista portuguesa de ortopedia e traumatologia**, v. 22, n. 4, p. 431-38, 2014.

NOBESCHI, M. L. **Osteologia**. Instituto de imagem em saúde-CIMAS, 2010.

NODDACK, W; TACKE, I; BERG, O. Die ekamangane. **Naturwissenschaften**, v. 13, n. 26, p. 567-74, 1925.

OLIVEIRA, E. A. *et. al.* Radiotracers for different angiogenesis receptors in a melanoma model. **Melanoma research**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2012.

OLIVEIRA, R. *et. al.* Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Braz j pharm sci**, v. 42, p. 152-64, 2006

OLLIER, L. **Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux**. Paris: V. Masson, 1867.

PASSOS, W. S. **Estudo da utilização de homoenxerto proveniente de banco de tecidos**. 2013.

PAVELKA, K. Osteonecrosis. **Best practice & research clinical rheumatology**, v. 14, n. 2, p. 399-414, 2000.

PELED, E. *et. al.* Prevention of distortion of vascular deprivation-induced osteonecrosis of the rat femoral head by treatment with alendronate. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v. 129, n. 2, p. 275-79, 2009.

PERUCHI, F. M. *et. al.* Viabilidade do enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar: estudo experimental em ratos. **Rev bras ortop**, v. 47, n. 3, p. 372-77, 2012.

PETRIGLIANO, F. A; LIEBERMAN, J. R. Osteonecrosis of the hip: novel approaches to evaluation and treatment. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 465, p. 53-62, 2007.

PHEMISTER, D. B. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. **Surg gynecol obstet**, v. 19, n. 3, p. 303-33, 1914.

\_\_\_\_\_. Fractures of neck of fêmur, dislocation of hip and obscure vascular disturbances producing aseptic necrosis of head of fêmur. **Surg gynecol obstet**, v. 59 p. 415-40, 1934.

\_\_\_\_\_. Changes in bones and joints resulting from interruption of circulation I. General considerations and changes resulting from injuries. **Arch surg**, v. 41, n. 2, p. 436-72, 1940.

PIERSCHBACHER, M. D; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, n. 5963, p. 30-3, 1983.

PROSNITZ, L. R.; LAWSON, J. P.; FRIENDLAENDER, G.E.; FARBER, L. R.; PEZZIMENTI, J. F. Avascular necrosis of bone in Hodgkin's disease patients treated with combined modality therapy. **Câncer**, v. 47, n. 12, p. 2793-97, 1981.

QUEIROZ, S. B. F. D. *et. al.* Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs): conceitos, funções e aplicações clínicas. **Rev. paul. odontol**, v. 26, n. 4, p. 16-9, 2004.

REBOCHO, L. *et. al.* **Mecanobiologia do osso**: II. Microestrutura do osso compacto em estudos de paleodemografia. 2009.

REIS, N. D. *et. al.* Hyperbaric oxygen therapy as a treatment for stage-I avascular necrosis of the femoral head. **Bone & joint journal**, v. 85, n. 3, p. 371-75, 2003.

RENNEN, H. J. J. M. *et. al.* Effects of coligand variation on the in vivo characteristics of Tc-99m-labeled interleukin-8 in detection of infection. **Bioconjugate chemistry**, v. 13, n. 2, p. 370-77, 2002.

RENTSCH, C. *et. al.* Comprehensive histological evaluation of bone implants. **Biomatter**, v. 4, n. 1, p. e27993, 2014.

RHINELANDER, F. W. The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. **J Bone joint surg am**, v. 50, n. 4, p. 784-800, 1968.

RITTER, L. *et. al.* Accuracy of peri-implant bone evaluation using cone beam CT, digital intra-oral radiographs and histology. **Dentomaxillofacial radiology**, v. 43, n. 6, p. 20130088, 2014.

SADILE, F. *et. al.* Core decompression versus other joint preserving treatments for osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis. **British medical bulletin**, v. 118, n. 1, p. 33-49, 2016.

SAMARA, S. *et. al.* Bone morphogenetic proteins (BMPs) expression in the femoral heads of patients with avascular necrosis. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 7, p. 4465-72, 2013.

SEAMON, J. *et. al.* The pathogenesis of nontraumatic osteonecrosis. **Arthritis**, v. 2012, 2012. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518945/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518945/)> Acesso em: 10 jul. 2016.

SEGRÈ, E.; WU, C. S. Some fission products of uranium. **Physical review**, v. 57, n. 6, p. 552, 1940.

SEMPUKU, T. *et. al.* Vascularized tail bone grafts in rats. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 91, n. 3, p. 502-10, 1993.

SHABAT, S. *et. al.* Osteonecrosis in a chemically induced rat model of human hemolytic disorders associated with thrombosis—a new model for avascular necrosis of bone. **Calcified tissue international**, v. 74, n. 3, p. 220-28, 2004.

SHARAREH, B; SCHWARZKOPF, R. Dysbaric osteonecrosis: a literature review of pathophysiology, clinical presentation, and management. **Clin J sport med**, v. 25, n. 2, p. 153-61, 2015.

SHIGUETOMI, M. J. M.*et. al.* Estimations of bone metabolism using specialized sequences of functional magnetic resonance imaging (MRI). A new method of study. **Rev mex ortop ped**, v.14, n. 1, p. 35-9, 2012.

SHIM, K.; MACKENZIE, M. J.; WINQUIST, E. Chemotherapy-associated osteonecrosis in cancer patients with solid tumors: a systematic review. **Drug saf**, v. 31, n. 5, p. 359-71, 2008.

SHOAKAZEMI, A; FLANNERY, T; McCONNELL, R. S. Long-term outcome of subcutaneously preserved autologous cranioplasty. **Neurosurgery**, v. 65, n. 3, p. 505-10, 2009.

SIGNORE, A. *et. al.* Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. **European journal of nuclear medicine**, v. 28, n. 10, p. 1555-65, 2001.

SIMS, N. A; MARTIN, T. J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. **BoneKEy reports**, v. 3, 2014.

SINGLA, N. *et. al.* Histopathology of subcutaneously preserved autologous bone flap after decompressive craniectomy: a prospective study. **Acta neurochirurgica**, v. 156, n. 7, p. 1369-73, 2014.

SOPENA NOVALES, P. *et. al.* Medicina nuclear y radiofármacos. **Radiología**, v. 56, p. 29-37, 2014.

STEINBERG, M. E; STEINBERG, D. R. Osteonecrosis: Historical perspective. In: KOO, Kyung-Hoi; MONT, Michael A.; JONES, Lynne C. **Osteonecrosis**. Heidelberg: Springer Berlin, p. 3-15, 2014.

TACHI, K. *et. al.* Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in osteoblasts. **Cell and tissue research**, v. 342, n. 2, p. 213-20, 2010.

TEODORO, R. **Avaliação pré-clínica do análogo da neurotensina (8-13) radiomarcado com  $^{99m}\text{Tc}$ : caracterização in vitro e in vivo**. 2014. Tese (Doutorado) - Tecnologia Nuclear – Aplicações, Universidade de São Paulo, 2010.

TERZI, H. *et. al.* Efeito da multiparidade sobre a densidade mineral óssea, avaliada por marcadores de remodelação óssea. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 2, n. 6, nov./dez. 2015.

TREMOLEDA, J. L. *et. al.* Imaging technologies for preclinical models of bone and joint disorders. **Ejnmri res**, v. 1, n. 1, p. 11, 2011.

TRUETA, J; CALADIAS, A. X. A study of the blood supply of the long bones. **Surgery, gynecology & obstetrics**, v. 118, p. 485, 1964.

TURPIN, S.; LAMBERT, R. Role of scintigraphy in musculoskeletal and spinal infections. **Radiologic clinics of north america**, v. 39, n. 2, p. 169-89, 2001.

URIST, M R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, v. 220, n. 4598, p. 680-86, 1983.

VICENTE, J. R. N. *et. al.* Artrodese do quadril: uma opção terapêutica abandonada?. **Acta ortopédica brasileira**, v. 19, n. 5, 2012.

VON STILLFRIED, E.; WEBER, M. A. [Aseptic osteonecrosis in children and adolescents]. **Der orthopade**, v. 43, n. 8, p. 750-57, 2014.

WANG, C. *et. al.* Bone microstructure and regional distribution of osteoblast and osteoclast activity in the osteonecrotic femoral head. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96361, 2014.

WEHRLI, F. W. Structural and functional assessment of trabecular and cortical bone by micro magnetic resonance imaging. **Journal of magnetic resonance imaging**, v. 25, n. 2, p. 390-409, 2007.

WEILAND, A J; MOORE, J. R; DANIEL, R K. Vascularized Bone Autografts Experience with 41 Cases. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 174, p. 87-95, 1983.

WEINER, R. E; THAKUR, M. L. Radionuclides: Applications in Diagnostic and Therapeutic Nuclear Medicine. **Radiochimica acta**, v. 70, n. s1, p. 273-88, 1995.

WOZNEY, J. M. *et. al.* Growth factors influencing bone development. **J cell sci**, v. 1990, n. Supplement 13, p. 149-56, 1990.

WU, G. *et. al.* Safety and pharmacokinetics of dicloxacillin in healthy Chinese volunteers following single and multiple oral doses. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 5687, 2015.

XU, X. L. *et. al.* Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years. **J transl med**, v. 11, p. 303, 2013.

ZALAVRAS, C. G; LIEBERMAN, J. R. Osteonecrosis of the femoral head: evaluation and treatment. **Journal of the american academy of orthopaedic surgeons**, v. 22, n. 7, p. 455-64, 2014.

ZANETTE, E. *et. al.* Avaliação do diagnóstico densitométrico de osteoporose/osteopenia conforme o sítio ósseo. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 47, n. 1, p. 30-6, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302003000100006&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302003000100006&lng=en)>. Acesso em: 25 mar de 2016

ZHELEZNYAK, A. *et. al.* Integrin  $\alpha\beta3$  as a PET imaging biomarker for osteoclast number in mouse models of negative and positive osteoclast regulation. **Molecular imaging and biology**, v. 14, n. 4, p. 500-8, 2012.

ZHOU, Y; CHAKRABORTY, Su; LIU, S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as radiotracers for imaging tumors and thrombosis by SPECT. **Theranostics**, v. 1, p. 58-82, 2011.

## ANEXO

### ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



*Comitê de Ética no Uso de Animais*

#### **Parecer - Projeto Nº 93/11/CEUA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"NEOVASCULARIZAÇÃO NA NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR APÓS TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO: AVALIAÇÃO ATRAVÉS DE PEPTÍDEOS RADIOMARCADOS EM MODELO ANIMAL"** de responsabilidade da pesquisadora **DRA. BLUMA LINKOWSKI FAINTUCH** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 28 de outubro de 2011



Prof. Dra. Nanci do Nascimento  
Coordenadora do CEUA-IPEN