



Universidade Federal
de São João del-Rei

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS NATURAIS (DCNat)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
(PPGCM)

ALISSON KENNEDY REZENDE

**EFEITOS SISTÊMICOS DA TOLERÂNCIA ORAL NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO DE RATOS *Wistar* NAS FASES DE OSSIFICAÇÃO E
REMODELAMENTO ÓSSEO**

São João del Rei, Minas Gerais

Julho/2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS NATURAIS (DCNat)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
(PPGCM)**

**EFEITOS SISTÊMICOS DA TOLERÂNCIA ORAL NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO DE RATOS WISTAR NAS FASES DE OSSIFICAÇÃO E
REMODELAMENTO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (PPGCM) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase em Morfologia.

Pós-Graduando: Alisson Kennedy Rezende

Orientadora: Prof. Dr.^a Érika Lorena Fonseca de Alvarenga.

Coorientador: Prof. Dr. Álvaro César de Oliveira Penoni.

São João del Rei, Minas Gerais

Julho /2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R467e Rezende, Alisson Kennedy.
EFEITOS SISTÊMICOS DA TOLERÂNCIA ORAL NO REPARO
DE DEFEITO ÓSSEO DE RATOS Wistar NAS FASES DE
OSSIFICAÇÃO E REMODELAMENTO ÓSSEO / Alisson Kennedy
Rezende. Resende; orientadora Érika Lorena Fonseca
de Alvarenga. Alvarenga; coorientador Álvaro César
de Oliveira Penoni. Penoni. -- São João del-Rei,
2022.
134 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais) -- Universidade Federal de
São João del-Rei, 2022.

1. Tecido ósseo. 2. Zéina. 3. Ensaios Mecânicos.
4. Tolerância Oral. I. Alvarenga, Érika Lorena
Fonseca de Alvarenga., orient. II. Penoni, Álvaro
César de Oliveira Penoni., co-orient. III. Título.



Universidade Federal
de São João del-Rei



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI / UFSJ
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

Aos 22 dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e dois, às 13h30, na sala Sala C.314, do Departamento de Ciências Naturais, no Campus Dom Bosco, localizado na Pça Dom Helvécio, 74, bairro Dom Bosco - São João del-Rei /MG, e com transmissão via videoconferência pela plataforma Google Meet (meet.google.com/hwk-mvwo-utk), e portanto de forma híbrida, foi instalada a banca examinadora de dissertação de mestrado do discente **Alisson Kennedy Rezende**. A banca examinadora foi composta pelo professor Dr. Antônio Carlos Shimano (USP), examinador externo, pela professora Dra. Raquel Alves Costa (UFSJ), examinadora interna, pelo professor Dr. Álvaro César de Oliveira Penoni (UFSJ), coorientador, e pela professora Dra. Érika Lorena Fonseca de Alvarenga. A professora Dra. Érika Lorena Fonseca de Alvarenga, Presidente da Banca, fez a abertura dos trabalhos e, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou ao candidato que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada **"Efeitos Sistêmicos da Tolerância Oral no Reparo de Defeito Ósseo de Ratos Wistar nas Fases de Ossificação e Remodelamento Ósseo"**, marcando um tempo de até sessenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a Profa. Érika Lorena Fonseca de Alvarenga, presidente, passou a palavra ao examinador externo, Prof. Antônio Carlos Shimano (USP), para arguir o candidato, e, em seguida, à examinadora interna, Profa. Raquel Alves Costa, e ao coorientador, Prof. Álvaro César de Oliveira Penoni, para que fizessem o mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o resultado da avaliação da banca, conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del-Rei, foi: **APROVADA a defesa SEM a necessidade de alterações substanciais na dissertação**. A versão final da dissertação, deverá ser entregue ao programa no prazo de 90 (noventa) dias, a contar a partir da data da defesa (Resolução Consu N°062, de 07 de novembro de 2011, modificada pela Resolução CONSU N° 005, de 29 de fevereiro de 2016). O candidato não terá o título senão cumprir as exigências acima descritas.



Emitido em 22/07/2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 1/2022 - PPGCM (13.43)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 13:54)

ALVARO CESAR DE OLIVEIRA PENONI

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

COEFI (12.45)

Matrícula: 2362132

(Assinado digitalmente em 02/08/2022 14:19)

ERIKA LORENA FONSECA COSTA DE

ALVARENGA

COORDENADOR DE CURSO - TITULAR

PPGCM (13.43)

Matrícula: 2279745

(Assinado digitalmente em 02/08/2022 13:26)

RAQUEL ALVES COSTA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

PPGCM (13.43)

Matrícula: 2104326

(Assinado digitalmente em 03/08/2022 09:50)

ANTONIO CARLOS SHIMANO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 323.220.206-3

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: **1**, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **02/08/2022** e o código de verificação: **267f7372ea**

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Naturais (DCNat), no Laboratório de Microscopia, no Laboratório de Esterilização e Laboratório de Cardiofisiologia e Biologia Molecular do campus Dom Bosco na Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), Minas Gerais, com o apoio financeiro da UFSJ e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus** e a todos os **Espíritos de Luz** que me cuidaram, guiaram e me acalmaram nos momentos em que mais precisei e também nos momentos em que eu julguei não precisar.

À professora **Prof. Dr.^a Érika Lorena Fonseca de Alvarenga**, pela acolhida, orientação, disponibilidade, ensinamentos e voz ativa.

Ao **Prof. Dr. Álvaro César Penoni**, não só pela coorientação, mas por ter sido um divisor de águas em minha vida profissional desde o meu ingresso na graduação. Foi o primeiro fisioterapeuta que tive contato, ministrou diversas disciplinas as quais despertaram ainda mais o interesse pela docência. Posteriormente, me acolheu em sua empresa me ensinando o verdadeiro valor clínico e humano da fisioterapia. Passei de estagiário a membro ativo do corpo clínico durante 08 anos. Por fim, um grande incentivador a cursar a pós-graduação, oferecendo sua própria moradia para que eu me instalasse de forma confortável durante o período recorrente aos experimentos.

A minha colega de laboratório e agora amiga **Rafaela Barreto**. Cheguei ao laboratório com ausência completa de experiência, pois me dediquei ao longo dos anos aos atendimentos clínicos. Somado ao pico pandêmico vivido pelo mundo em 2021, permanecemos sozinhos por um longo período e com toda sua calma e didática me ensinou passo a passo uma variedade de situações. Além de ser uma ótima companhia de conversas relativas à vida.

Ao meu colega e agora amigo **Bruno Costa** por TODOS os ensinamentos, pela disponibilidade, paciência, conversas, inúmeras reuniões nos mais diversos horários e contextos possíveis. Muito obrigado, você foi mais que essencial para conclusão desse trabalho!

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano e demais membros** do departamento de Biomecânica, medicina e reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), pela excelente acolhida, ensinamentos e disponibilidade em colaborar com partes dos experimentos.

À **Prof. Dr.^a Claudia Rocha Carvalho** e **Prof. Dr.^a Raquel Alves Costa**, pela colaboração metodológica. Aos demais professores **membros da banca avaliadora**.

Aos **professores que fizeram parte da minha formação (ensino básico até pós-graduação)**, em especial minha orientadora de graduação **Prof. Nívea Maria Saldanha Lagoeiro Alvarenga**, pelo incentivo de sempre!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (PPGCM)** a **Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPE)** e a **Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ)**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** pelo financiamento do projeto.

Aos meus **amigos pessoais**, pelo apoio e paciência (Marcos Paulo, Renan Fraga, Júlio Freitas e Juliano Mendes).

Aos **meus pais** (Sebastião e Lúcia) pelo apoio incondicional.

GRATIDÃO SUPREMA!

Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

Lista de abreviaturas:

Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio

ALP – Fosfatase alcalina

ANOVA – Análise de variância

ANG-1 – Angiopentina 1

APCs - Células apresentadoras de antígenos

BMPs – Proteínas morfogenéticas ósseas

BSP – Sialoproteína óssea

Ca²⁺ - Íon Cálcio

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ – Cristais de Hidroxiapatita

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

Ca₃(PO₄)₂ – Fosfato de cálcio

CAPI - Centro de processamento de imagens

CCL2 – Ligante da quimiocina 2

CD8 – Glicoproteína transmembranal receptor de células T

CEUA – Comissão de Ética na utilização de animais

COBEA - Colégio brasileiro de experimentação animal

CMO – Conteúdo mineral ósseo

DCs – Células dendríticas

DMP1 – Proteína 1 da matriz de dentina

DMO – Densidade mineral óssea

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

Fc – Receptor Fetal

FGF - Fator de crescimento de fibroblasto

FOXO1 - Forkhead Box

GAPs - Células calciformes

GALT – Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

GDF- 5 – Fator de crescimento e diferenciação

H⁺ - Íon Hidrogênio

HA – Hidroxiapatita

H;E - Hematoxilina Eosina

HCL - Ácido clorídrico

HSCs – Células tronco progenitoras hematopoiéticas
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ – Interferon gama
IgA – Imunoglobulina A
IgG - Imunoglobulina G
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-17F – Interleucina 17F
LLs – Linfócitos intraepiteliais
I.P. - Intraperitoneal
KG - Kilogramas
LAP - Peptídeo associado a latência
LP - Lâmina própria
M-CSF – Fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos
MHC-I - Complexo de histocompatibilidade 1
MHC-II - Complexo de histocompatibilidade 2
MLN - Linfonodo mesentérico
MM – Milímetros
MMP-9 – Metaloproteína de matriz 9
MMP-14 - Metaloproteinase-14

MLN – Linfonodos mesentéricos

MSCs – Células tronco mesenquimais
N - Newton
NO – Óxido Nítrico
OC – Osteocalcina
OCN – Osteonectina
OPG - Osteoprotegerina
OPN – Osteopontina
OVA - Ovalbumina
P – Fósforo
PGE2 – Prostaglandina E2

pH – Potencial hidrogeniônico

PP – Placas de Peyer

PPI – Megapixels

PTH - Paratormônio

RANK - Receptor ativador do fator nuclear K β

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear K β

RUNX2 - Fator de transcrição chave para diferenciação osteoblástica

TG – Triglicerídeos

TGF β – Fator de crescimento beta

TGI - Trato gastro intestinal

TNF α – Fator de necrose tumoral

TO – Tolerância oral

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tártaro

TRegs – Células T reguladoras

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFSJ – Universidade Federal de São João del Rei

USP - Universidade de São Paulo

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de figuras:

Figura 1 - Corte transversal da diáfise de tíbia de rato <i>Wistar</i> corado em Hematoxilina & Eosina	20
Figura 2 - Representação esquemática das partes corticais e esponjosas de um osso longo	22
Figura 3 - Representação esquemática do microambiente ósseo	25
Figura 4 - Representação esquemática das propriedades biomecânicas do tecido ósseo	27
Figura 5 - Representação gráfica do comportamento de tensão <i>versus</i> deformação do tecido ósseo	28
Figura 6 - Representação gráfica das características biomecânicas do tecido ósseo macroscópico	29
Figura 7 - Representação esquemática das fases sobrepostas do processo de reparo ósseo	31
Figura 8 - Representação esquemática dos principais eventos durante o processo de reparo ósseo pós-traumático	35
Figura 9 - Representação esquemática do eixo RANK - RANKL - OPG	37
Figura 10 - Representação esquemática das principais vias de entrega de antígeno transeptelial	43
Figura 11 - Representação esquemática dos mecanismos da tolerância imunológica	48
Figura 12 - Alojamento e posicionamento das gaiolas dos animais no biotério setorial	54
Figura 13 - Representação gráfica do monitoramento da temperatura ambiente durante os períodos experimentais	54
Figura 14 - Materiais utilizados para enriquecimento ambiental	56
Figura 15 - Representação esquemática dos grupos experimentais trabalhados e suas respectivas doses de imunizações	58
Figura 16 - Representação esquemática do delineamento dos períodos experimentais	59
Figura 17 - Etapas dos procedimentos pré e pós cirúrgicos	61
Figura 18 - Imagem fotográfica representativa da tíbia direita pós eutanásia e seu respectivo ponto de defeito ósseo	62

Figura 19 - Corte transversal da diáfise de tíbia de rato <i>Wistar</i> corado em HE para padronização de áreas para contagem de osteócitos	65
Figura 20 - Análise de densitometria óssea	67
Figura 21 - Interface do software Lunar® utilizado para o exame densitometria óssea	68
Figura 22 - Representação esquemática de força de cisalhamento agindo em um corpo de prova	69
Figura 23 - Procedimentos de inclusão de tíbias direitas em resina acrílica polimetilmetacrilato	70
Figura 24 - Tíbia incluída em resina e posicionada na máquina de ensaio de cisalhamento	71
Figura 25 - Representação do relatório numérico obtido após o ensaio biomecânico de cisalhamento	72
Figura 26 - Representação do relatório gráfico obtido após o ensaio biomecânico de cisalhamento	72
Figura 27 - Representação esquemática de força de flexão em três pontos agindo em um corpo de prova	73
Figura 28 - Tíbia esquerda posicionada na máquina de ensaio biomecânico de flexão em três pontos	74
Figura 29 - Representação gráfica do ganho de peso ponderal ao longo dos períodos experimentais	76
Figura 30 - Representação gráfica da ingestão alimentar ao longo dos períodos experimentais	77
Figura 31 - Representação gráfica do peso das tíbias direitas (defeito) e esquerdas (intactas)	78
Figura 32 - Representação gráfica do peso dos úmeros direitos e esquerdos	79
Figura 33 - Representação gráfica dos resultados dos exames de Densitometria mineral óssea	81
Figura 34 - Representação gráfica dos resultados do ensaio biomecânico de cisalhamento em tíbias direitas	82
Figura 35 - Representação gráfica dos resultados do ensaio biomecânico de flexão em três pontos em tíbias esquerdas	83
Figura 36 - Cortes transversais de tíbias de ratos <i>Wistar</i> coradas com H&E, 28 dias pós defeito	85
Figura 37 - Representação gráfica de análises quantitativas em 28 dias pós defeito	87

Figura 38 - Cortes transversais de tíbias de ratos <i>Wistar</i> coradas com H&E, 45 dias pós defeito -----	89
Figura 39 - Cortes transversais de tíbias de ratos <i>Wistar</i> coradas com Tricômico de Gomori, 45 dias pós defeito -----	91
Figura 40 - Representação gráfica de análises quantitativas em 45 dias pós defeito -----	93
Figura 41 - Representação gráfica de análises semi quantitativas 28 e 45 dias pós defeito -----	95

Lista de quadros:

Quadro 1 - Delineamento de análises histológicas	57
Quadro 2 - Delineamento de análises biomecânicas.....	57
Quadro 3 - Legenda de score patológico para comparação do reparo de lesões ósseas entre os grupos experimentais	64
Quadro 4 - Resultado de score patológico para comparação do reparo de lesões ósseas entre os grupos experimentais	94

Sumário:

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. Morfologia do tecido ósseo	19
2.2. Células do tecido ósseo	22
2.3. Biomecânica óssea	26
2.4. Reparo ósseo	31
2.4.1. Inflamação	32
2.4.2. Reparo	33
2.4.3. Remodelamento	34
2.5. Mecanismos regulatório do remodelamento ósseo	35
2.6. Tolerância Oral	41
2.6.1. O TGI como barreira seletiva	42
2.6.2. Indução da tolerância oral	46
2.6.3. Mecanismos da tolerância oral	47
2.6.4. Adjuvantes	49
2.6.5. Efeitos indiretos	50
3. Objetivos	52
3.1. Objetivo Geral	52
3.2. Objetivos Específicos	52
4. Material e Métodos	53
4.1. Animais e ética experimental	53
4.2. Alojamento e alimentação	53
4.3. Bem-estar animal	55
4.4. Delineamento experimental	56
4.5. Indução da tolerância oral à proteína zeína	58
4.6. Osteotomia da tíbia direita (defeito ósseo)	59
4.7. Processamento histológico	62
4.7.1. Descalcificação por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	62

4.7.2. Inclusão, microtomia e coloração	63
4.7.3. Análises Morfométricas em microscopia de luz	63
4.8. Análises Mecânicas Ósseas	66
4.8.1 . Densitometria óssea	66
4.8.2. Ensaio mecânico de flexão em três pontos do tipo cisalhamento	68
4.8.3. Ensaio biomecânico de flexão em três pontos do tipo bi-apoiado	73
5. Apresentação dos dados e estatística	75
6. Resultados	76
6.1. Aspectos gerais em relação a saúde animal	76
6.2. Avaliação das propriedades minerais ósseas e suas respectivas propriedades biomecânicas	80
6.3. Avaliação histomorfométrica do processo de reparo ósseo 28 e 45 dias pós defeito	83
7. Discussão	96
8. Conclusão	104
9. Perspectivas	104
10 . Referências Bibliográficas	105
11. Anexo (Aprovação CEUA)	130
12. Anexo 2 (Ensaio de flexão em três pontos do tipo Cisalhamento)	131
13. Anexo 3 (Ensaio de flexão em três pontos do tipo Bi-apoiado)	133

Resumo:

Além de vitaminas, carboidratos e fibras, o milho presente em nossa dieta, oferece variedades proteicas tais como a zeína. Essa proteína, após o contato com o sistema imunológico via trato gastrointestinal, é capaz de induzir a tolerância imunológica antigênica. Trabalhos vêm demonstrando que a reexposição pela via intraperitoneal de proteínas previamente ingeridas pode melhorar o reparo de feridas cutâneas, com diminuição de granulomas, entre outros efeitos sistêmicos. Contudo, ainda não há registros dos efeitos tolerogênicos sistemáticos da tolerância oral no reparo do tecido ósseo pós lesão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos sistêmicos da proteína zeína tolerizada e reexposta por via parenteral no processo de reparo ósseo (28 e 45 dias) pós osteotomia em tíbias de ratos. Foram utilizados 120 ratos *Wistar* machos, com 12 semanas de idade, sendo divididos em três grupos experimentais, com aplicação via *i.p.* de: Salina (GS), Adjuvante (Al(OH)₃) (GA) e Zeína associada ao adjuvante (GZ). Realizou-se osteotomia de 2mm nas tíbias direitas, e nos tempos experimentais de 28 e 45 dias pós defeito análises histomorfométricas, densitometria mineral óssea (DMO) e testes biomecânicos foram executados. O monitoramento de peso tanto ponderal como das tíbias osteomizadas não demonstrou alteração entre os grupos. Já na análise da DMO observamos diferenças significativas entre os grupos GS e GA. Já entre os tempos experimentais do GZ não houve diferença, sugerindo que em 28º dia pós defeito a mineralização óssea é maior. O ensaio biomecânico de cisalhamento realizado nas tíbias direitas apontou diferença significativa, apenas na variável força máxima do GZ, indicando que em 45 dias pós defeito o tecido tornou-se mais resistente a forças mecânicas externas. Na avaliação histológica observamos aceleração no processo de reparo no GZ em relação aos demais grupos no período de 28 dias pós defeito e similaridade entre todos os grupos no período de 45 dias pós defeito. Os resultados do presente trabalho demonstram a ação benéfica e sistêmica da tolerância oral, pós imunização por proteína previamente ingerida, nas fases de ossificação e remodelamento ósseo, sendo necessário mais estudos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos e geração de novas formas terapêuticas futuras.

Palavras-Chaves: Reparo ósseo, tolerância oral, zeína, biomecânica.

Abstract:

Besides vitamins, carbohydrates and fiber, maize in our diet provides a variety of proteins such as zeine. This protein, after contact with the immune system through the gastrointestinal tract, has the ability to induce antigenic immune tolerance. Studies have shown that the re-exposure of previously ingested proteins can improve the repair of skin wounds, with reduced granuloma and other systemic effects. However, data on the systematic tolerative effects of oral tolerance in bone tissue repair following injury are not yet available. Therefore, the objective of this study was to evaluate the systemic effects of the tolerized and parenterally re-exposed zeine protein in the bone repair process (28 and 45 days) after osteotomy in tibias of rats. Have been used 120 male Wistar rats, 12 weeks old, were divided into three test groups, with i.p. application of: Saline (GS), Adjuvant (Al(OH)₃) (GA) and Adjuvant Zeine (GZ). A Osteotomy of 2mm was carried out in the right tibias, and in experimental time of 28 and 45 days after histomorphometric fault analyses, bone densitometry (BMD) and biomechanical tests were conducted. Weight monitoring of both weight and osteomized tibias showed no change between groups. In the BMD analysis, we observed significant differences between the GS and GA groups. Weight monitoring of both weight and osteomized tibias showed no change between groups. In the BMD analysis, we observed significant differences between the GS and GA groups. Between the experimental time of GZ there was no difference, suggesting that on the 28th day after defect bone mineralization is higher. The biomechanical shear test performed on the right tibias showed a significant difference, only in the variable maximum force of GZ, indicating that in 45 days after defect the tissue became more resistant to external mechanical forces. In the histological evaluation we observed acceleration in the repair process in GZ in relation to the other groups in the period of 28 days post defect and similarity between all groups in the period of 45 days post defect.

Keywords: bone repair, oral tolerance, zein, biomechanics

1. INTRODUÇÃO:

As características alimentares e nutricionais, representam desde o período pré-histórico, fortes traços da relação harmônica da vida humana com o ambiente. Essa sinergia simbiótica, garante ciclos de trocas com o meio físico e o social, transgredindo pela corrente evolução humana (BATISTA FILHO, 2010). Além do traço cultural, a atividade alimentar relaciona-se diretamente com a vitalidade de cada organismo, a fim de suprir as demandas energéticas, mantendo o ciclo biológico homeostático (SOUZA LIMA *et al.*, 2015).

A variedade alimentar e a escolha da ingestão de cada grupo alimentício, estão intimamente correlacionadas à localização geográfica associada aos hábitos culturais (MACIEL, 2012). O Brasil, um país de dimensões continentais, influenciado pela variedade de tradições, fruto dos nossos povos antepassados e colonizadores, oferece uma extensa variedade de produtos e subprodutos alimentares (MARTINELLI; CAVALLI, 2019).

Entre toda variedade ofertada, destacam-se majoritariamente grãos como soja e o milho. Ambos cereais, testemunharam de forma relevante a expansão do território destinado ao agronegócio, associado principalmente à adoção e difusão de avanços técnico-científicos (BORLACHENCO; BARBOSA GONÇALVES, 2017). Desde então, estes grãos passaram a integrar a base da dieta cotidiana de uma consistente parcela da população, além de fornecer matéria prima básica para fabricação de profusa variedade alimentícia associadas a outras bases nutricionais (FAGEER; EL TINAY, 2004).

Entre os grãos supracitados, o destaque fica a favor do milho. O grão oferece abundante quantidade e variedade de nutrientes, oriundos de farelos, óleos, amido, amilose, além de uma potente e ainda pouco explorada proteína denominada zeína (MU-FORSTER; WASSERMAN, 1998; PAPALIA, 2015).

A zeína é caracterizada como uma das proteínas provenientes do endosperma dos grãos de milho, classificada dentro do grupo das prolaminas que contém um extenso teor de aminoácidos em cadeias apolares e estruturas moleculares hidrofóbicas (SHUKLA; CHERYAN, 2001). Em percentuais, em um único grão de milho, a zeína pode ocupar cerca de 60% do total das demais proteínas

presentes e atualmente vem se destacando como excipiente matéria prima base para produção de tintas, adesivos, revestimentos plásticos, além de uma importante fonte protéica para a organismo humano (LI *et al.*, 2020).

O processo de digestão proteica inicia-se na boca, com ação da alfa-amilase, resultando em quebra de partículas em diminutas porções peptídicas iniciando um complexo processo bioquímico (COSTANZO, 2018). Posteriormente, as porções peptídicas são direcionadas ao estômago para desnaturação polipeptídica pela ação do ácido clorídrico (HCL) e hidrolização pela enzima pepsina rompendo as ligações existentes entre os aminoácidos. No ramo intestinal, ocorre a clivagem das cadeias mais complexas juntamente com catálise da pró-enzima pancreática (tripsinogênio) em tripsina mediada pela liberação da enteroquinase, produzida pelas células do duodeno (GUYTON; HALL, 2017).

Embora essa orquestra metabólica seja eficiente, algumas partículas proteicas são degradadas de forma parcial e absorvidas por vilosidades que se prolongam profundamente na mucosa formando criptas e interagindo com células do sistema imune inato. Anatomicamente, essas células estão localizadas na submucosa do intestino delgado, reunindo agregados de nódulos linfóides denominados de placas de Peyer (PP), um importante componente do tecido linfóide associado ao trato digestivo (TORDESILLAS; BERIN, 2018; WAKABAYASHI *et al.*, 2006).

A cinética que corresponde ao processo de exposição antigênica dietética ao trato gastrointestinal (TGI) e por consequência a absorção particulada, induz a tolerância imunológica contra o antígeno correspondente (MOWAT *et al.*, 1982). Essa cascata de eventos, deriva na diminuição da reatividade imunológica associada à produção de anticorpos e é classicamente registrada pela literatura como tolerância oral (FARIA; WEINER, 1999; VAZ *et al.*, 1977; WAMBRE; JEONG, 2018)

Estudos recentes apresentam de maneira satisfatória a influência dos efeitos da tolerância oral nos mecanismos de reparo em diversos tecidos (PAIATTO *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2006). Costa *et al.*, (2016) concluíram melhoras significativas no processo de reparo de feridas excisionais de pele em camundongos, tolerizados oralmente com a proteína ovalbumina

(OVA). Os resultados apontaram redução do processo inflamatório na área da lesão e melhoria do padrão de deposição de colágeno, tornando o tecido próximo ao padrão inicial. Um ano mais tarde, Cantaruti *et al.*, (2017), utilizaram outra fonte proteica antigênica (zeína) e seus resultados também apontaram para importante melhora no reparo de feridas excisionais de pele em camundongos em relação aos grupos controles. Recentemente, Franco-Valencia *et al.*, (2022), concluíram ainda que os efeitos sistêmicos da tolerância oral, podem melhorar a cicatrização de feridas cutâneas, quando a mesma ocorre dentro de um intervalo de 5 dias após a injeção subcutânea da proteína zeína em animais previamente tolerizados.

A literatura aponta evidências da relação benéfica dos efeitos indiretos da tolerância oral nos mecanismos de reparo dos tecidos pela modulação do sistema imune e intercessão nos processos inflamatórios iniciais (CARVALHO *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2006). Essa fase, torna-se um ponto de intercomunicação direta do sistema imunológico com os tecidos subjacentes, a fim de restabelecer a homeostasia dinâmica tecidual (LOI *et al.*, 2016; MARUYAMA *et al.*, 2020).

O processo de reparo ósseo pós-traumático é codependente da etapa inflamatória de modo que, alterações como exacerbações ou supressão dessas fases pode alterar significativamente a cinética de recuperação do tecido (BAHNEY *et al.*, 2019; GIBON *et al.*, 2017; GOODMAN *et al.*, 2019). Contudo, o vasto universo que envolve o tecido ósseo, esse nicho torna-se praticamente inexplorado no contexto da intercomunicação sistêmica relativa aos efeitos da tolerância oral.

Rocha *et al.*, (2018), ressaltaram o gradual aumento da expectativa de vida da população brasileira ao longo das últimas décadas, com crescimento de 25 milhões de idosos no ano de 2020. Segundo a projeção apontada no estudo, em 2050 a expectativa de vida brasileira será em média de 81,29 anos de idade. O Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) associa este aumento de expectativa de vida aos avanços nas áreas clínicas da saúde (IBGE, 2020).

Em contrapartida, idosos são frequentemente acometidos por quedas acompanhadas de fraturas, principalmente em decorrência da diminuição da densidade mineral óssea (DMO), perda de minerais essenciais como o cálcio (Ca^{2+}), fósforo (P) e enfraquecimento das propriedades biomecânicas ósseas, impactando na curva ascendente de expectativa de vida e alavancando potencialmente os custos aos cofres públicos (BURR, 2019; LOPES *et al.*, 2018). Em paralelo, traumas automobilísticos e quedas entre adultos jovens ocasionam graves fraturas ósseas, retardando a retomada das atividades funcionais e laborais e refletindo ao montante final de custos para a saúde pública (SENEFONTE *et al.*, 2012).

Empenhados em desenvolver terapias que auxiliem no processo de reparo ósseo, pesquisadores de diversas áreas vêm debruçando seus esforços para evidenciar formas de melhoria da qualidade e cinética de recuperação destes distúrbios. Destaca-se por exemplo, o uso da bioengenharia aliada às células tronco (ABE *et al.*, 2012), o uso da eletroterapia como a estimulação ao reparo ósseo (LEPPIK *et al.*, 2018) e o ultrassom pulsado de baixa intensidade (RUBIN *et al.*, 2001).

Entretanto, ainda se faz necessário explorar diferentes áreas de conhecimentos, oferecendo como base de pesquisas meios minimamente invasivos e de custo acessível para todas as classes sociais. Uma possível alternativa, seria o meio dietético através da tolerização pela proteína zeína, visto que toda a população tem acesso ao milho ou a produtos derivados.

Os resultados da relação entre a tolerância oral e o processo de reparo do tecido ósseo vêm sendo estudados de forma pioneira pelo nosso grupo de pesquisa, apontando fortes evidências na correlação da ação da proteína zeína no processo de reparo do tecido ósseo nas fases inflamatórias e remodelamento ósseo (COSTA, 2021). A área de investigação de nossa pesquisa, oferece grandes expectativas para resultados robustos, sendo um amplo, inovador e promissor campo de estudos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 - Morfologia do tecido ósseo:

Os ossos são constituídos por tecido conectivo especializado, que opostamente relacionado às variáveis formas de tecido conjuntivo, apresenta componentes extracelulares em formas mineralizadas (MURSHED, 2018). Essa característica, confere propriedades biomecânicas essenciais para proteção de órgãos vitais e locomoção de organismos vertebrados (WEATHERHOLT *et al.*, 2012).

O processo cinético de formação e desenvolvimento ósseo é realizado por duas vias distintas: a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral. Morfologicamente esses mecanismos responsáveis pela osteogênese diferem pela ausência ou presença da fase cartilaginosa (HU; OLSEN, 2016).

A ossificação intramembranosa está relacionada com a formação de ossos chatos localizados principalmente no crânio (JIN; SIM; KIM, 2016). Entretanto, essa via contribui de forma sinérgica para o crescimento longitudinal e espessura de ossos longos pela ação das células tronco mesenquimais (MSCs) localizadas no tecido conjuntivo de revestimento, que diferenciam em células osteoprogenitoras e mais tarde em células osteoblásticas secretoras de matriz óssea. Em contrapartida, a ossificação endocondral tem por base a formação de ossos longos (exemplo: úmero, fêmur tíbia), a partir de um modelo de cartilagem hialina que se expande longitudinalmente, em concomitância com a hipertrofia condrocítica e posteriores apoptoses (YUAN; CHAI, 2019). As cavidades oriundas dos condrócitos apoptóticos, permanecem expostas na matriz e são invadidas por capilares sanguíneos e células osteoprogenitoras que assim como na ossificação intramembranosa, diferenciam-se em osteoblastos sintetizando matriz óssea (YANG *et al.*, 2014 a; YUAN; CHAI, 2019).

Estruturalmente, o tecido ósseo é caracterizado como um dos mais resistentes e rígidos tecidos do corpo humano, possui funções primordiais como proteção de órgãos internos, apoio ao sistema musculoesquelético, formando alavancas assistentes ao movimento e excelência capacidade de manutenção da homeostase mineral, armazenando diferentes minerais, principalmente Ca^{2+} e P

(LOPES *et al.*, 2018). Participa ainda, de forma ativa, do processo hematopoiético por alojar em sua região medular nicho celular de linhagem progenitora de células hematopoiéticas e mesenquimais (denominada medula óssea vermelha), além de armazenar triglicerídeos (TG) formando a denominada medula óssea amarela, sendo uma importante reserva energética e bioquímica (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

A matriz óssea, está envolta por uma densa camada de tecido conjuntivo denominada periósteo. O periósteo é constituído por uma camada externa, chamada de camada fibrosa e uma íntima camada interna, chamada de osteogênica (DWEK, 2010; LIN *et al.*, 2014). Revestindo as superfícies internas dos ossos encontra-se o endósteo, que é constituído por pouco tecido conjuntivo e uma delgada camada de células osteogênicas de morfologia achatada. Assim como o periósteo, a principal função do endósteo é a nutrição e abastecimento de células da linhagem osteoblástica ao tecido (FIGURA 1) (BAHNEY *et al.*, 2019).

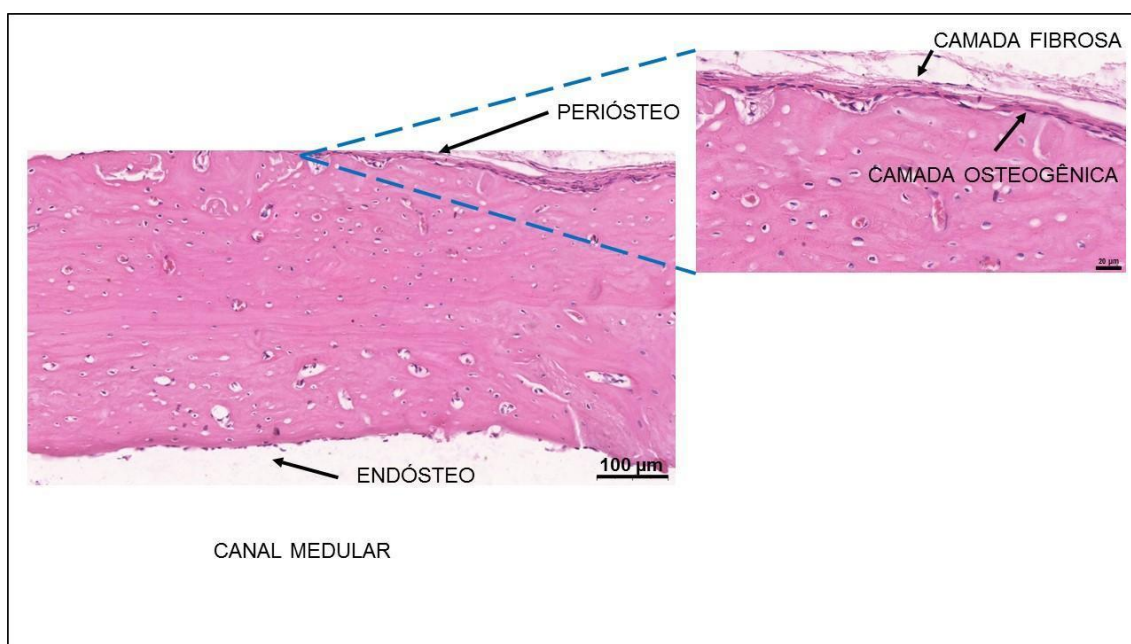


FIGURA 1: Corte transversal corado em hematoxilina & eosina (H & E) da diáfise de tíbia de rato *Wistar*. Região externa circundada pelo periósteo. Ampliação delimitando a camada fibrosa e a camada osteogênica. Região interna, íntima a medula óssea circundada pelo endósteo. Fonte: O próprio autor.

Ainda ao nível macroscópico, encontramos dois tipos distintos de tecidos ósseos: O osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso (FIGURA 2) (BIRD; KIVELL; SKINNER, 2021). Externamente, logo abaixo do perióstio, o osso apresenta uma densa camada de depósito de matriz extracelular, com poucos espaços e de aspecto biomecânico resistente, o tecido cortical ou compacto (DWEK, 2010; LIN *et al.*, 2014).

Esse tecido é composto por inúmeras unidades estruturais, conhecidas como osteons. Cada osteon, apresenta lamelas formadas por matriz extracelular calcificada, que estão dispostas em formas concêntricas, distribuídas em torno de um canal, o canal de Havers. Esse canal é abastecido por uma rede vascular e uma rede de terminações nervosas (LEFÈVRE *et al.*, 2019). Pela disposição anatômica das lamelas, lacunas são formadas e osteócitos que estão englobadas pela matriz calcificada, se comunicam entre si e com outras células do tecido, através dos canalículos abundantes em líquidos extracelulares (FIGURA 2) (LAD; MCGRAW; DAEGLING, 2019; MAGGIANO *et al.*, 2016).

A região trabecular do tecido ósseo, pode ser classificada como um material heterogêneo, anisotrópico e de peso estrutural leve (OFTADEH *et al.*, 2015). Encontrada nas epífises e metáfises dos ossos longos e também nos corpos vertebrais, essa rede trabecular forma uma estrutura rígida e dúctil que fornece estrutura para a medula óssea, tanto a medula vermelha, produtora de células sanguíneas, quando a medula óssea e amarela (tecido adiposo) e está sempre recoberto pela parte compacta do tecido (FIGURA 2) (TURUNEN *et al.*, 2020; WARZECHA *et al.*, 2018).

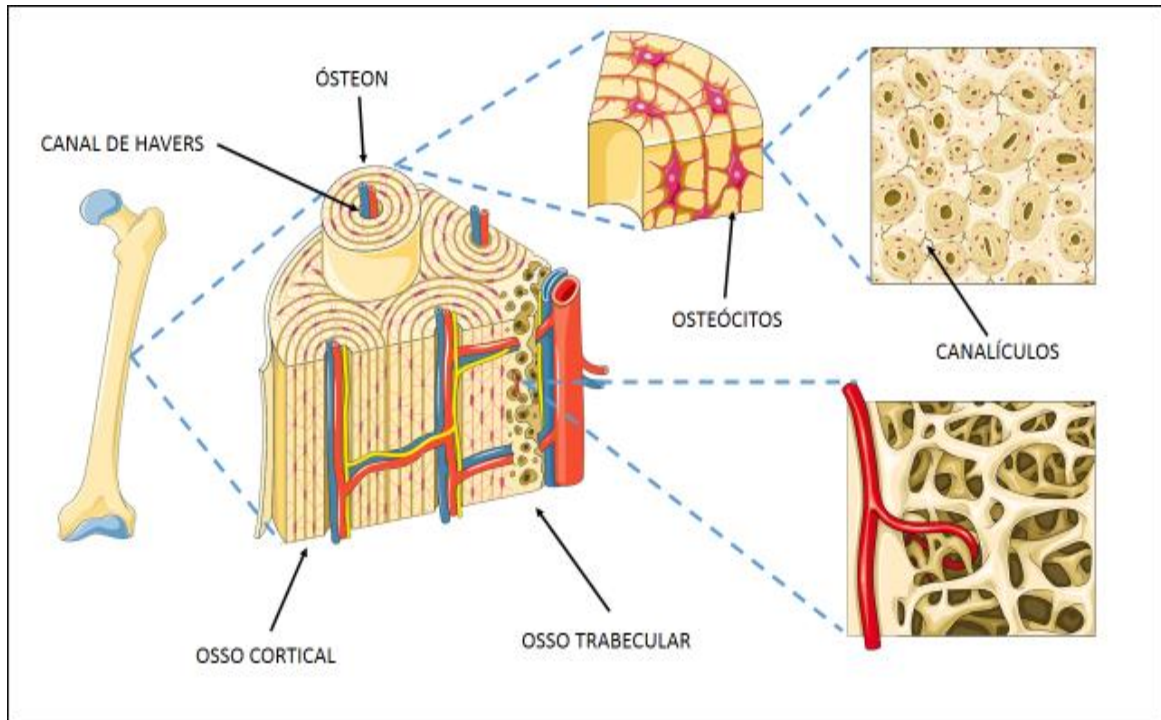


FIGURA 2: Representação esquemática das partes corticais e esponjosas de um osso longo. Na parte cortical há a presença de lamelas concêntricas formando os osteons e o canal da Havers ao centro. Presença de osteócitos englobados pela matriz óssea calcificada e suas intercomunicações canaliculares. Fonte: Adaptado de LOPES *et al.*, 2018. Imagens: <https://smart.servier.com>.

2.2- Células do tecido ósseo:

Diferentes tipos celulares são responsáveis pela manutenção de toda essa rede funcional e da homeostase do tecido ósseo, sendo as principais: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (HU *et al.*, 2019).

Derivadas das MSCs (FIGURA 3 A) as células osteoprogenitoras, apresentam-se morfológicamente em formato achatado, com núcleos alongados ou ovoides e a presença bem delimitada de organelas citoplasmáticas como o retículo endoplasmático rugoso, ribossomos e diminutas áreas de complexo de golgi (FIGURA 3 B). Essas características morfológicas, são condizentes de células que após a expressão de fatores de transcrição, como por exemplo o fator de transcrição chave para diferenciação osteoblástica (RUNX2), se diferenciam em

pré-osteoblastos (FIGURA 3 C) e posteriormente em osteoblastos, células mais ativas e secretoras (ANSARI, 2019; BEU *et al.*, 2017).

Morfologicamente, as células osteoblasticas apresentam formato cuboide, com o citoplasma basófilo, permanecendo agrupadas ao longo da superfície óssea e funcionalmente são destinadas principalmente a síntese da matriz óssea orgânica, constituída basicamente de colágeno do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas (FIGURA 3 D) (LEE *et al.*, 2017). Essas células, podem ser classificadas em dois subgrupos funcionais: células osteoblasticas mesenquimais e células osteoblásticas de superfície. Sob a matriz óssea MSCs diferenciam-se em osteoblastos mesenquimais, secretando colágeno por toda a extensão matricial. Posteriormente, os osteoblastos de superfície sintetizam fibrilas colagênicas de maneira perpendicular e orientada a estrutura óssea, originando estruturas lamelares conferindo a capacidade de flexibilidade e resistência ao tecido (LOPES *et al.*, 2018; SALHOTRA *et al.*, 2020).

A osteonectina é uma glicoproteína responsável pela interação química do Ca^{2+} da matriz óssea, associada a liberação da fosfatase alcalina (ALP) pelas células osteoblásticas. Essa enzima promove a liberação de grupamentos fosfato realizando interações bioquímicas do colágeno com cálcio sérico, formando os cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (MURPHY *et al.*, 2017; PIVONKA ; DUNSTAN, 2012; ROSSET ; BRADSHAW, 2016). A osteocalcina que também é produto da síntese dos osteoblastos, por sua vez, está relacionada ao controle e ao processo de regulação da maturação óssea pela capacidade de concentração de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (KOMORI, 2020).

Os osteócitos são células abundantes, que fazem parte do repertório de 90 a 95% do total de células ósseas que foram envolvidas pela própria matriz óssea depositada, quando ainda estavam na fase ativa osteoblastica (HUANG *et al.*, 2020). A região do corpo celular está localizando na lacuna mineral, cercado por fluidos capazes de oferecer oxigênio e nutrientes, mantendo a viabilidade celular.

O processo de conversão de osteoblastos para osteócitos é denominado osteocitogênese, no qual a chave para diferenciação é a proteína e sua interação com outras proteínas como a CD44. Essa cascata interativa forma um complexo

que ativa a organização de filamentos de actina e miosina do citoesqueleto em regiões da célula nas quais os processos dendríticos serão formados. (TRESGUERRES *et al.*, 2020).

Morfológicamente, são células com estruturas elípticas, menos volumosas que os osteoblastos e que sofrem mudanças organizacionais em organelas e em proteínas do citoesqueleto como a tubulina e a actina. Apresentam projeções citoplasmáticas mediadas pela expressão da E11, iniciando seu crescimento antes mesmo da mineralização óssea (FIGURA 3 E). Essas projeções encontram-se envolvidas por uma rede canalicular, ofertada pela ação da metaloproteinase-14 (MMP-14) que degrada a matriz extracelular a fim de realizar intercomunicações celulares (LOPES *et al.*, 2018; SALHOTRA *et al.*, 2020; TRESGUERRES *et al.*, 2020).

Funcionalmente, são responsáveis pelo controle do metabolismo ósseo diário e manutenção da matriz orgânica, sintetizando proteínas como a osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), proteína 1 da matriz de dentina (DMP1) e proteoglicanos (BONEWALD, 2011). São ativados pela via Wnt/ β catenina de forma parácrina e pela secreção da proteína esclerotina, controlando expressões gênicas de fatores como Runx2 e Osterix, importantes para a proliferação e maturação de células osteoblásticas (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016).

Por fim, desempenham a importante função mecanorreceptora, transduzindo sinais mecânicos captados pela superfície óssea em reações bioquímicas (AMBROSI; LONGAKER; CHAN, 2019; HEMMATIAN *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2015). Essas células que estão imersas em fluídos pericelular, ao serem submetidas a esforços biomecânicos externos, promovem movimentação de fluído nos canálculos, promovendo forças de arrasto nos osteócitos desencadeando respostas fisiológicas específicas para manutenção tecidual (VAN TOL *et al.*, 2020).

O processo de reabsorção da matriz óssea ocorre pela ação de células osteoclásticas (ONO; NAKASHIMA, 2018). Estas células são caracterizadas por terem origem da linhagem hematopoiética (FIGURA 3 G, F), com a proliferação

dos precursores osteoclásticos através da expressão do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e diferenciação em osteoclastos ativos através da expressão de RANKL (LOPES *et al.*, 2018).

Morfologicamente, células osteoclásticas apresentam pregueamento em formato de escova, amplificando sua superfície de contato entre a célula e a zona que será degradada (DRISSI; SANJAY, 2016). Essa estrutura torna-se responsável por criar uma zona de adesão, denominada zona clara ou zona selada, entre o corpo celular e a matriz a ser degradada. Concomitantemente, há secreções locais de H^+ e proteases, como a catepsina K, a metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9) e a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), que realizam em conjunto um intenso processo bioquímico resultando na degradação da matriz óssea (FIGURA 3 H) (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; KODAMA, 2020; SHIRAKAWA *et al.*, 2019).

Sendo assim, a ação conjunta destas células no microambiente ósseo, garantem o sincício entre ação de síntese matricial pelas células osteoblásticas e absorção pelas osteoclasticas mediadas principalmente pelos osteócitos.

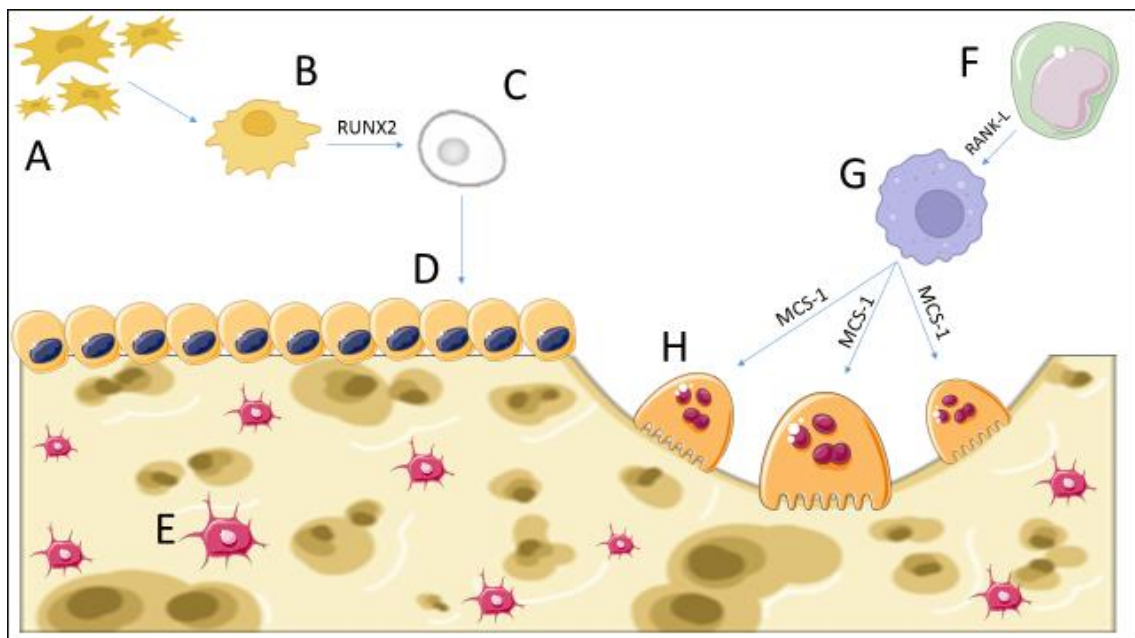


FIGURA 3: Representação esquemática do microambiente ósseo. A) MSCs B) Célula osteoprogenitora derivada de MSCs C) Célula pré osteoblástica D) Osteoblastos ativos E) Osteócitos F) Monócito G) Pré - Osteoclasto H) Osteoclastos em atividade. Fonte: Adaptado de LOPES *et al.*, 2018. Fonte das Imagens <https://smart.servier.com>.

2.3 - Biomecânica Óssea:

Biomecanicamente o tecido ósseo pode ser descrito como um material bifásico, com estruturas compostas por sais minerais inorgânicos e matriz orgânica (HART *et al.*, 2017). O fosfato de cálcio confere a rigidez ao tecido e são responsáveis pela resistência a forças de compressão. O colágeno confere a propriedade biofísica de elasticidade e juntamente com a água contribui para a resistência à tração ao tecido ósseo (TEMIYASATHIT; JACOBS, 2010).

Em física básica, o conceito de força é tido como um vetor que provoca aceleração em um determinado corpo em movimento ou, se o corpo estiver estático, o mesmo vetor de força realiza deformação. A força iminente de cada tecido, está relacionada a sua capacidade de resistir a cargas ou sobrecargas impostas (MORGAN; UNNIKRISSAN; HUSSEIN, 2018). Um conjunto de forças externas que age nos tecidos biológicos, conceitualmente, é definido como forças biomecânicas (RADASCH, 1999). Funcionalmente, no tecido ósseo, essas forças são definidas como compressão, tração, cisalhamento, flexão e torção e a combinação entre elas.

A força de compressão pode ser observada quando a força é aplicada de forma a reduzir a dimensão do material longitudinalmente, reduzindo seu volume, ou seja, aumentando seu diâmetro (FIGURA 4 A) (BEAUPIED; LESPESSAILLES; BENHAMOU, 2007; CORDEY, 2000; DEL C. CATELLO *et al.*, 2017). A tensão (tração) ocorre quando a força é aplicada de forma perpendicular à superfície do material de forma a aumentar seu comprimento axial e em consequência, reduzir seu diâmetro (FIGURA 4 B) (HART *et al.*, 2017; TURNER; BURR, 1993). Quando cargas externas são aplicadas de formas tangenciais a superfície do material, impondo um deslizamento em relação a sua adjacente, denomina-se cisalhamento (FIGURA 4 C) (BIEWENER, 1991; DALMOLIN *et al.*, 2013). A flexão ocorre quando cargas externas tendem a flexionar a região longitudinal provocando a compressão em uma face e a tração na face antagônica (FIGURA 4 D) (CORDEY, 2000; DALMOLIN *et al.*, 2013). Por fim, a torção é caracterizada pela ação conjunta de forças externas que tendem a girar o material em torno do seu eixo longitudinal, estando com suas extremidades fixas (FIGURA 4 E) (FRANKEL; KAPLAN; EGOL, 2016; LILL *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2014b).

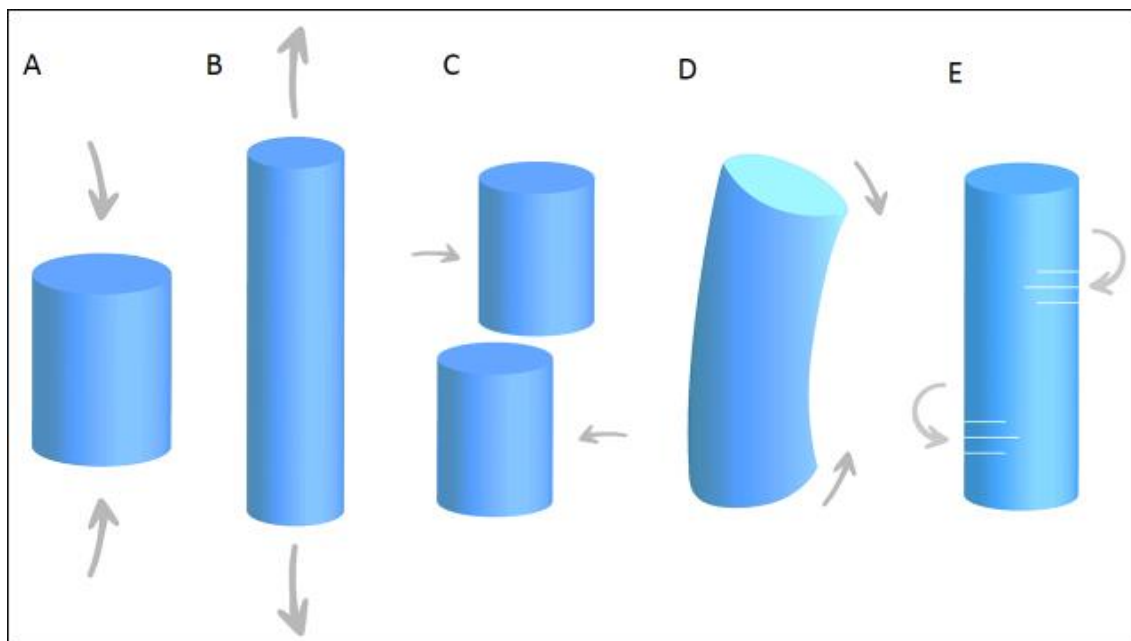


FIGURA 4: Representação esquemática das propriedades biomecânicas do tecido ósseo. A) Compressão B) Tensão/tração C) Deslizamento ou cisalhamento D) Flexão E) Torção. Fonte: Adaptado MARGARETA; FRANKEL, 2014.

A relação entre tensão *versus* deformação pode ser expressa em um gráfico, no qual uma curva revela os parâmetros mecânicos de um determinado material. No tecido ósseo podemos identificar duas características funcionais de deformações, sendo a capacidade elástica e a capacidade plástica (FIGURA 5) (HART *et al.*, 2017; ROE, 2020).

A capacidade elástica é a capacidade do tecido retomar a forma original após a remoção da carga imposta, sem a ocorrência de micro danos processuais (EINHORN, 1992). Quando essa mesma estrutura não mais retoma a sua dimensão original (pós remoção da carga) e essa deformação residual permanece, nomeia-se de comportamento plástico. Ao ultrapassar o limiar plástico, mesmo ao cessar a força aplicada, o tecido mantém uma deformação residual e não retoma suas características fisiológicas basais (AHN; GRODZINSKY, 2009; PEARSON; LIEBERMAN, 2004).

Após atingir o ponto máximo da região plástica e a carga externa permanecer exercendo a força mecânica, o material enfraquece e atinge o ponto de falha (FRASSICA *et al.*, 1997; HART *et al.*, 2017). Esse ponto de falha indica que a

capacidade suportada pelo tecido ultrapassou o ponto de resistência, gerando danos teciduais em forma de microfissuras (BURR, 2011; COLE; VAN DER MEULEN, 2011; ZIMMERMANN *et al.*, 2014).

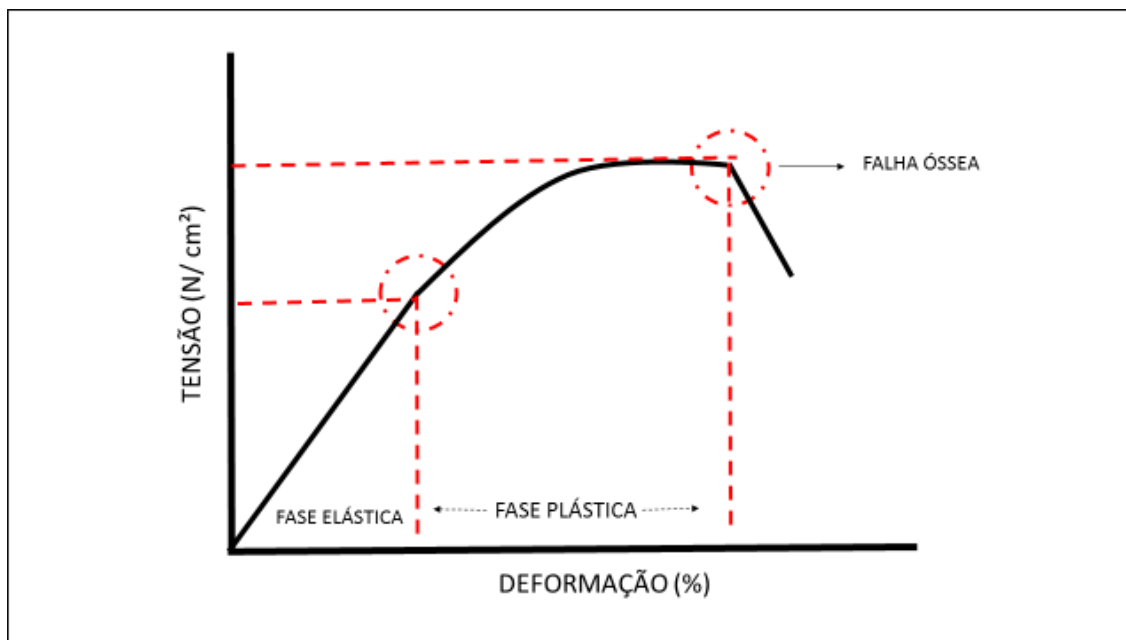


FIGURA 5: Representação gráfica do comportamento de tensão versus deformação do tecido ósseo, mediante cargas externas impostas. Fase elástica: Ao cessar a carga, o material retoma suas características basais escapando de micro danos processuais. Fase Plástica: A estrutura não retoma mais suas características iniciais. Falha óssea: Ponto em que o tecido não suporta mais carga e sofre o rompimento gerando danos em forma de microfissuras. Fonte: O próprio autor.

A quantificação da porção mineral associada primariamente com a densidade de porosidade óssea determina, de maneira consistente, a qualidade do material ósseo e suas respostas mecânicas frente a cargas externas (DAVISON *et al.*, 2006; ZEBAZE *et al.*, 2010). Essas características influenciam na capacidade do tecido de resistir a deformações, absorver tensões (elasticidade) e energias antes de atingir a falha mecânica (resistência máxima) (HART *et al.*, 2017).

O comportamento gerado pela tensão versus deformação óssea difere entre a base micro estrutural em resposta a bioarquitetura subjacente do tecido (BEAUPIED; LESPESSAILLES; BENHAMOU, 2007; SZABÓ *et al.*, 2011). A área cortical apresenta-se de forma mais rígida que a área trabecular, conferindo maior

suporte de estresse e menor tensão antes do tecido atingir a falha mecânica (FIGURA 6). Já tecidos com morfologia porosa, como a região trabecular, fornecem maior elasticidade, suportando níveis mais modestos de estresses e níveis tensionais maiores antes da falha mecânica (FIGURA 6) (CURREY, 2003; HART *et al.*, 2017).

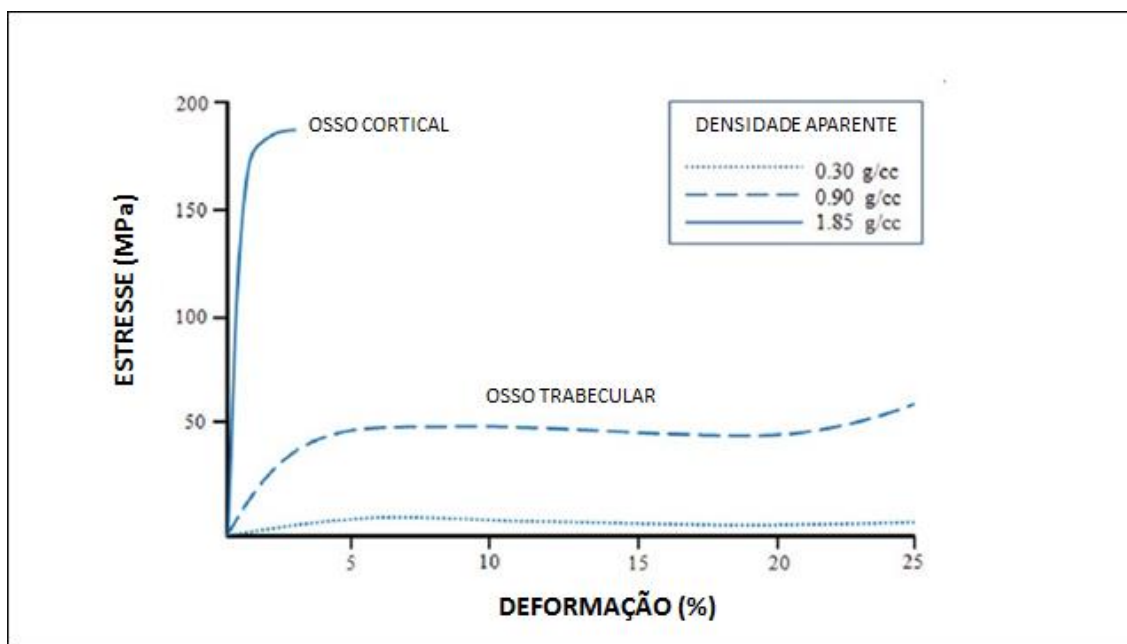


FIGURA 6: Representação gráfica das características mecânicas do tecido ósseo macroscópico. Osso cortical é mais rígido com alta resistência ao estresse e baixa resistência à deformação. Osso trabecular é morfologicamente poroso com baixa resistência ao estresse e alta resistência à deformação. Fonte: Adaptado de HART *et al.*, 2017.

As características estruturais, morfológicas e orgânicas, juntamente com a associação dos cristais de hidroxiapatita, se acoplam de maneiras dinâmicas às características biofísicas do tecido que, sob uma ação mecânica externa, sofre modificações espaciais estruturais, produzindo a polarização elétrica pelos efeitos da piezoelectricidade (LIND; BÜNGER, 2001).

Em contexto semântico, a palavra piezoelectricidade significa “eletricidade de pressão”. O prefixo piezo deriva-se da palavra grega *piezin* = pressão (FUKADA; YASUDA, 1957). Esse estímulo piezoelectrico ocasiona uma discreta deformação na matriz óssea que atua livremente nas integrinas, induzindo as respostas a nível do núcleo celular (HAUGH; VAUGHAN; MCNAMARA, 2015). Em resposta a

estímulos mecânicos e graças a estruturas morfológicas compatíveis, as integrinas presentes no tecido ósseo sofre gradientes pressóricos exercendo forças de arrasto (compressão e tração) no interior do sistema lacunocanalicular, resultando em movimentação do fluido nos processos citoplasmáticos dos osteócitos. As áreas compressivas resultam em acúmulos de cargas elétricas negativas e a região que sofre tracionamento resulta em cargas elétricas positivas, ambas capazes de modular a resposta celular (SCOTT *et al.*, 2008).

Esse conjunto de eventos provoca ativação de canais iônicos (Ca^{2+} , K^+), com modulação celular eletrofisiológica, resultando em alteração do potencial elétrico de membranas para hiperpolarização (estímulo osteogênico) ou despolarização (estímulo de reabsorção) da membrana plasmática (BUTCHER *et al.*, 2008; YOKOTA; TANAKA, 2005).

Esses processos metabólicos alteram moléculas de sinalização, tais como WNTs, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), RANKL, osteoprotegerina (OPG) resultando em transcrições, expressões de proteínas e receptores específicos que modulam, recrutam e diferenciam a atividade osteoblástica e osteoclástica no tecido (KLEIN-NULEND *et al.*, 2015).

A capacidade do tecido ósseo de remodelar-se é proporcional ao tipo e intensidade de estímulos oferecidos pelo meio (KLEIN-NULEND; BACABAC; BAKKER, 2012). A base inicial dessa ideia foi descrita em 1892 por Julius Wolff, objetivando ressaltar a forma em que o tecido ósseo se adapta perante a cargas externas (LINDBERG *et al.*, 2015).

Em paralelo a Lei de Wolff, estabelecida por Julius Wolff (1984), o princípio bioquímico da mecanotransdução realiza a conversão de estímulos mecânicos em respostas biológicas. Essas reações ocorrem em cadeias, atuando em níveis celulares, causando inibição da apoptose, proliferação celular e alterações no próprio direcionamento da migração de células, entre outros efeitos (LIEDERT *et al.*, 2006).

Compreender as propriedades mecânicas do tecido ósseo permite uma melhor avaliação da qualidade da estrutura óssea, por meio de seus parâmetros biomecânicos, sendo de extrema relevância para estudos clínicos que buscam

meios de adaptações e regenerações durante processos de fraturas ósseas (MORGAN; UNNIKRISSAN; HUSSEIN, 2018).

Os eventos inflamatórios que ocorrem durante o processo de reparo de uma lesão óssea também devem ser associados e relacionados de maneira direta com as características biomecânicas do tecido (MORGAN; UNNIKRISSAN; HUSSEIN, 2018). Assim, torna-se possível esclarecer se eventos de níveis celulares e moleculares interferem na qualidade óssea, fornecendo maior confiabilidade nas futuras intervenções terapêuticas.

2.4- Reparo Ósseo:

Quando acometido por lesões, o tecido ósseo possui excelência no mecanismo de auto regeneração (GHIASI *et al.*, 2017). Podemos dividir, em caráter fisiológico, processos distintos que se sobrepõem automaticamente entre essas fases, sendo elas: Inflamação, reparo (formação de calo mole e calo duro, respectivamente) e remodelamento (ONO; TAKAYANAGI, 2017; XIAO *et al.*, 2017) (FIGURA 7).

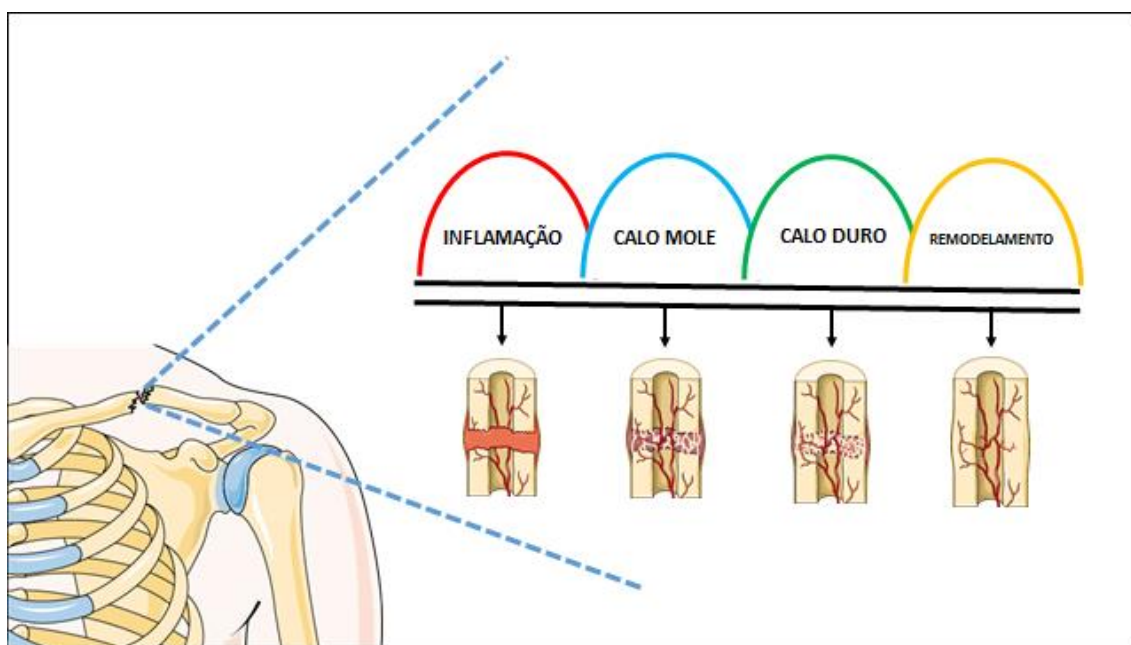


FIGURA 7: Representação esquemática das fases do processo de reparo ósseo. Inflamação, reparo (formação de calo mole e calo duro) e remodelamento ósseo. Fonte: O próprio autor. Imagens: <https://smart.servier.com>.

As MSCs, juntamente com as células pertencentes ao sistema imunológico (neutrófilos, macrófagos, linfócitos) realizam *crosstalk* entre si, modulando os eventos que permeiam todo conjunto pertencente ao reparo ósseo (MARUYAMA *et al.*, 2020). Os eventos regenerativos, assim como a qualidade final do processo, são altamente dependentes da fase inflamatória inicial, que por sua vez é dependente das respostas locais e sistêmicas ao estímulo lesivo (BAHNEY *et al.*, 2019; CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012b).

2.4.1- Inflamação:

No tecido ósseo, após um evento traumático há rupturas da vasculatura adjacente, além das superfícies do endósteo, periósteo e demais tecidos moles (LOI *et al.*, 2016). Ocorre a formação de coágulos (hematomas) em geral de 06 a 08 horas pós lesão, caracterizado por baixo pH, resultando na hipoxemia tecidual e ativação do plasma e das plaquetas expostas ao meio extra vascular. Essa cascata de coagulação sanguínea forma uma matriz provisória de fibrina e posteriormente há a ativação de neutrófilos provindos da medula óssea e citocinas pró inflamatórias pelo sistema imune inato e adaptativo, iniciando o processo fisiopatológico da inflamação (BRAGDON; BAHNEY, 2018; EINHORN; GERSTENFELD, 2015; MURPHY *et al.*, 2017).

Já instalados e em quantidades abundantes, neutrófilos e macrófagos iniciam a mediação de células pró inflamatórias e fatores de crescimento (LOI *et al.*, 2016), secretando quimiocinas, especialmente CCL2 (Ligante de quimiocina 2) para quimiotaxia de macrófagos de predominância M1 (pró inflamatórios) que por sua vez secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) (LONGONI *et al.*, 2018; RIOS ; TOUYZ ; MONTEZANO, 2017). Ainda sob influência direta macrófágica, há migração de linfócitos Th17 que contribuem através da secreção de IL17 para o estímulo e maturação de osteoblastos (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012). Entretanto, estudos como Nam *et al.*, (2012) e Longoni *et al.*, (2018), ressaltam que linfócitos TCD8+ podem inibir a formação osteogênica pela expressão de fatores inflamatórios como TNF α e IFN- γ no hematoma da fratura, porém a expressão de ambas citocinas são suprimidas graças a intensa ação da IL10 produzida pelo linfócito B IgM+ (FIGURA 8 A) (SUN *et al.*, 2017).

2.4.2 - Reparo:

Macrófagos são conhecidos por serem uma população extremamente plástica, adquirindo polarização da fenotipagem de macrófagos M1 para linha de macrófagos M2 (anti-inflamatórios) por sinalizações autócrinas e parácrinas de interleucina 4 (IL-4) o que indica a diminuição da fase inflamatória e progressão da fase de reparo tecidual (GIBON *et al.*, 2017). Há a proliferação da angiogênese e liberação de fatores essenciais como angiopoetina-1 (ANG -1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), graças ao perfil hipóxico do hematoma (GOERKE *et al.*, 2015; LONGONI *et al.*, 2018).

As MSCs provenientes do periósteo, medula óssea, vasos sanguíneos e tecido muscular adjacente diferenciam-se em condroblastos, iniciando o processo de secreção da fibrocartilagem e consequente formação de peças cartilaginosas (GIBON *et al.*, 2017; PIVONKA; DUNSTAN, 2012). Os condrócitos presentes, expressam o fator de transcrição SOX9, responsável no regulamento de genes para a sínteses da matriz cartilaginosa e formação do calo mole (cartilagem hialina), necessário neste momento para fornecer estabilidade biomecânica a fratura e moldagem para o processo seguinte (FIGURA 8 B) (CLAES *et al.*, 2012; GHIASI *et al.*, 2017).

Os condrócitos imaturos inseridos na matriz fibrocartilaginosa sofrem hipertrofia citoplasmática, silenciamento do gene SOX9, secreção de Ca^{2+} e do gene Forkhead Box (FOXO1), que se liga a região promotora do VEGF, estimulando o crescimento vascular interno (GERSTENFELD *et al.*, 2003). Sob a ação da hipervascularização local, células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos e a fibrocartilagem é mineralizada formando as trabéculas ósseas (PIVONKA; DUNSTAN, 2012; SALHOTRA *et al.*, 2020). O calo torna-se “duro” pela deposição de Ca^{2+} e P conferindo maior rigidez e estabilidade ao local do trauma (SHAPIRO, 2008). Os condrócitos inicialmente hipertrofiados sofrem apoptose, contudo Papachroni *et al.*, (2009), afirmam que alguns condrócitos são capazes de escapar dos processos apoptóticos e transdiferenciar em células osteoblásticas, auxiliando na deposição da matriz e substituindo a região trabecular de forma integral pela sinérgica ação de osteoblastos e osteoclastos (FIGURA 8 C).

2.4.3 - Remodelamento:

Findando o processo fisiológico de auto regeneração pós-traumática, a fase de remodelamento ósseo, segue-se o processo similar e característico de ossos não lesionados (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012a). Essa fase é marcada pela expressão de forma organizada de fatores locais e sistêmicos como calcitonina, hormônios da paratireoide (PTH), estrógeno e vitaminas e diminuição de fatores como TGF- β (MARUYAMA *et al.*, 2020; MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

A lacuna da fratura é substituída de forma sistemática pelo osso lamelar. Os osteoclastos reabsorvem a matriz produzida na formação óssea primária e também reabsorvem a formação óssea secundária, está depositada durante a reabsorção cartilaginosa. Este processo de reabsorção e produção de matriz óssea é balanceado pela atividade osteoclástica e a atividade osteoblástica proporcionando um aspecto ósseo similar ao anterior à fratura (FIGURA 8 D) (CLAES *et al.*, 2012; GHIASI *et al.*, 2017; SALHOTRA *et al.*, 2020).

Claes *et al.*, (2012b) e Einhorn (2015), afirmam que em meados a fase de remodelamento, os níveis metabólicos são completamente normalizados e ocorre um remodelamento completo dos vasos sanguíneos para redução das altas taxas de fluxo vascular ofertados durante a fase de reparo. Tangencialmente, a literatura aponta evidências acerca da funcionalidade de órgãos como o baço frente ao processo de reparo ósseo. Xiao *et al.*, (2017; 2018) conduziram estudos realizando esplenectomia do baço em camundongos, concluindo atraso no processo de reparo devido inibição sistemática de citocinas inflamatórias, recrutamento macrofágico e diminuição de expressão de RANKL e OPG.

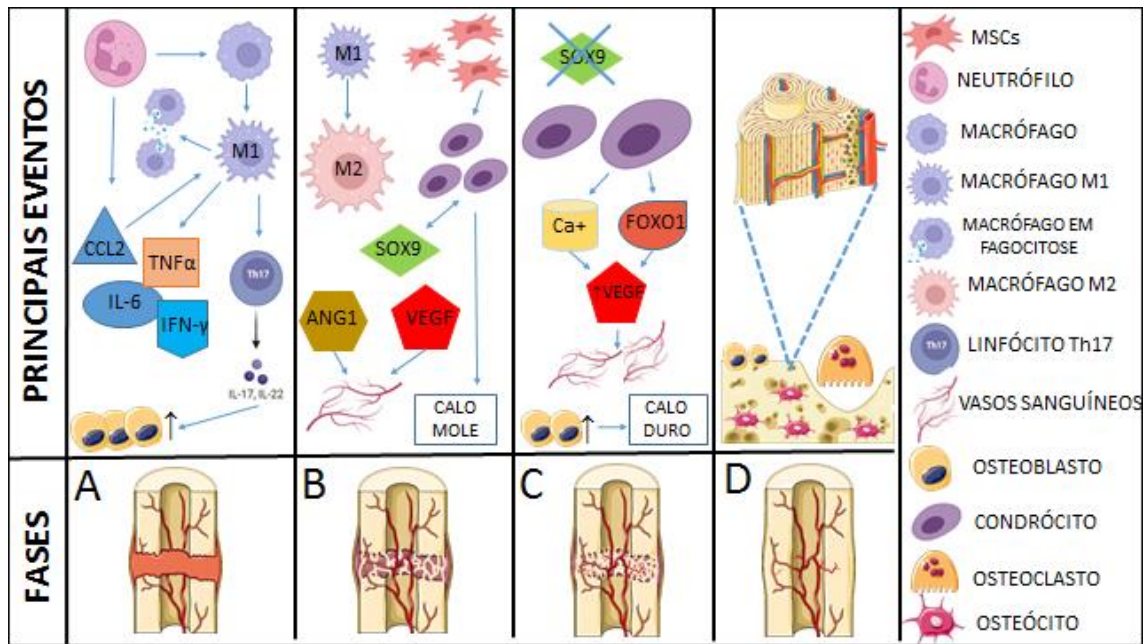


FIGURA 8: Representação esquemática das fases e seus respectivos eventos durante o processo de reparo ósseo pós-traumático. A) Inflamação: formação de coágulo e matriz de fibrina provisória. Recrutamentos de células fagocitárias com expressão de citocinas pró inflamatórias. B) Reparo: formação do calo mole, através da ação condrocítica. C) Formação do calo duro pela deposição mineral osteoblástica. D) Remodelamento: Restabelecimento humoral, hormonal e morfológico. Fonte: O próprio autor. Imagens obtidas através do site <https://smart.servier.com>.

2.5– Mecanismos regulatórios do remodelamento ósseo:

A cinética que envolve todas as fases do reparo ósseo é coordenada por sinalização de citocinas e proteínas que regulam de maneira direta e efetiva a proliferação de células ósseas como os osteoblastos e os osteoclastos (KOVÁCS; VAJDA; NAGY, 2019). Para que ocorra esse controle, um eixo harmônico, conhecido como RANK/RANKL/OPG atua de forma eficaz, garantindo o sucesso fisiológico dos processos, além de sinalizações endócrinas, parácrina e/ou autócrina (TANAKA *et al.*, 2018).

O sistema RANK/RANKL/OPG, foi descrito primordialmente no final da década de 1990 como o principal mecanismo composto do processo fisiológico de remodelamento ósseo (INFANTE *et al.*, 2019). É amplamente relacionado como um dos sistemas mais importantes na promoção da reabsorção óssea e sua

regulação está intimamente interligada com a diferenciação e ativação osteoclástica (PIVONKA *et al.*, 2010).

O ligante do ativador de receptor do fator nuclear Kappa B (RANKL), pertence a superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral e é uma proteína transmembranar do tipo 2. Desempenha fundamental papel na regulação e diferenciação dos osteoclastos e indispensável sua presença durante a osteoclastogênese (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; YASUDA, 2021). Expressa na membrana dos osteoblastos, osteócitos e células do estroma em forma solúvel, porém os osteócitos secretam de forma mais abundante essa proteína (NAKASHIMA *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2015).

O ativador de receptor do fator nuclear Kappa B (RANK) é uma proteína do tipo transmembranar do grupo 1, pertencente a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (NAGY; PENNINGER, 2015). Em sua constituição bioquímica, apresenta 616 aminoácidos, e peptídeos de sinais com um domínio extracelular ricos em cisteína. Uma característica do RANK é a não atividade enzimática no seu domínio intracelular, necessitando da interação química do RANKL para as transduções de sinais resultante na osteoclastogênese (MARAHEH *et al.*, 2019; VAN DAM *et al.*, 2019).

A OPG é uma citocina que faz parte da superfamília de receptores do TNF, com sequência homóloga ao RANK, projetando uma forte afinidade ao RANKL (BAUD'HUIN *et al.*, 2013). A terminologia OPG, é proveniente aos seus efeitos protetores de reabsorção no tecido ósseo (em latim, “os” é osso e “*protegere*” é proteger), inibindo de maneira direta a osteoclastogênese pela ligação ao RANKL (ROCHETTE *et al.*, 2019).

Em condições basais, os osteoblastos, osteócitos e as células endoteliais sintetizam a OPG após a estimulação por citocinas inflamatórias como o TNF α e a Interleucina 1 β (IL-1 β) alguns hormônios e compostos circulantes (CUNHA *et al.*, 2016; MARAHEH *et al.*, 2019; ROCHETTE *et al.*, 2019). A literatura traz robustos resultados de experimentos *in vivo*, que demonstraram que a OPG pode ser também sintetizada e liberada por neutrófilos e células tronco (LEE *et al.*, 2019; MILANOVA; IVANOVSKA; DIMITROVA, 2014; SCHAALAN; MOHAMED, 2017).

A proliferação direta da osteoclastogênese pede a ligação do ativador RANKL ao seu receptor RANK expresso e presente majoritariamente nas linhagens

macrocíticas/monocíticas provenientes da medula óssea, induzindo a fusão e diferenciação celular (MARAHLEH *et al.*, 2019; TANAKA *et al.*, 2018). Contudo, a citocina OPG torna-se fundamental no controle exacerbado dessa proliferação osteoclastica, atuando como um receptor solúvel inibindo a ligação do ativador RANKL ao receptor RANK junto a membrana monocítica (JURA-PÓLTORAK *et al.*, 2021; TONG *et al.*, 2021) (FIGURA 9).

O estudo de Ikebuchi *et al.*, (2018), traz a descoberta do *crosstalk* realizado pelo RANK presente na membrana dos osteoclastos ativos, envolvidos por vesículas e ligando ao RANKL solúvel, preparando os osteoblastos para uma maior e mais acelerada maturação. Um potencial alvo farmacológico para evitar a reduzida formação óssea associada à inibição das células osteoclasticas (FIGURA 9).

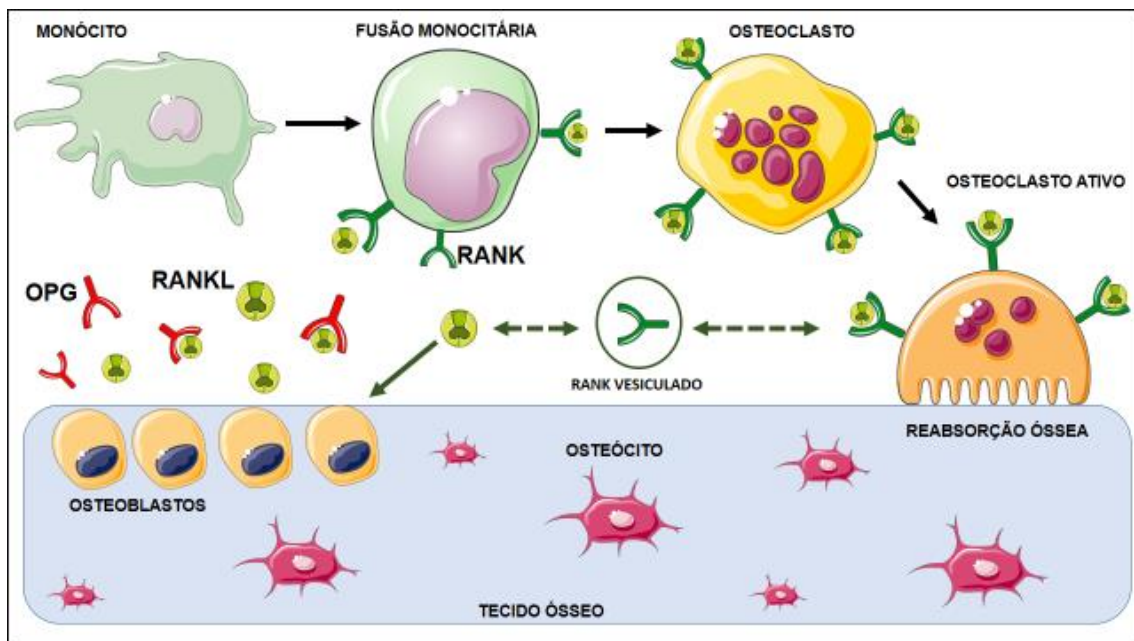


FIGURA 9: Representação esquemática do eixo RANK-RANKL-OPG. Células osteoblastica em atividade e osteócitos produzem o receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) que se liga ao receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANK) presente na linhagem monócitos/macrófagos, induzindo de forma orquestrada a atividade osteoclastica. Entretanto a citocina OPG, expressa majoritariamente pelos osteócitos e osteoblastos, inibe a ligação do RANKL ao seu receptor RANK, controlando a osteoclastogênese. *Crosstalk* entre RANK e RANKL para osteoblastogênese. Fonte: O próprio autor. Imagens obtidas através do site <https://smart.servier.com>.

Estímulos para a osteoblastogênese e/ou osteoclastogênese sofrem interferências diretas de hormônios regulatórios como PTH, calcitonina e o

estrogênio que atuam diretamente no eixo RANK/RANKL/OPG (XIAO *et al.*, 2015).

O PTH é um hormônio que contém uma cadeia de 84 aminoácidos que se liga aos seus receptores específicos presentes no rim e no tecido ósseo, pela cadeia 1-34 (WHITFIELD; MORLEY; WILLICK, 1999). Sua cinética envolve principalmente o aumento da excreção renal de P e aumento da absorção renal de Ca^{2+} (BRACCO; KAYATH; VIEIRA, 2003).

A membrana plasmática de células paratireoides, apresentam receptores extremamente sensíveis, que respondem de forma efetiva as flutuações de níveis séricos desse mineral (CENTENO *et al.*, 2019). Em resposta, a redução dos níveis circulantes de Ca^{2+} (hipocalcemia), estimula a expressão de genes responsáveis pela transcrição direta do PTH (DELGADO-CALLE *et al.*, 2017).

No tecido ósseo, esse hormônio atua nas células osteoblásticas, promovendo a síntese e secreção de RANKL estimulando a osteoclastogênese. Portanto, a redução dos níveis séricos de Ca^{2+} aumenta os níveis de reabsorção óssea pela cascata ativada do eixo sistêmico de RANK/RANKL/OPG (NOTOYA *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2018).

A calcitonina é um hormônio polipeptídico, de cadeia simples composto por 32 aminoácidos. É sintetizado pelas células C da glândula tireoide, também conhecidas como células parafoliculares, que estão em associação com as células epiteliais em resposta ao aumento da concentração sérica de Ca^{2+} (hipercalcemia) (LEKO *et al.*, 2022; SRINIVASAN; WONG; KARPONIS, 2020).

A ação desse hormônio frente ao tecido ósseo, se dá no mecanismo fisiológico de reabsorção óssea promovido pela rede osteoclastica ativa. As bordas enrugadas secretam hidrolases ácidas na zona selada para a degradação da matriz mineralizada. A calcitonina promove a internalização de proteínas presente na região anatômica da borda enrugada em vesículas intracelulares, impedindo a liberação ácida, bloqueando o processo de reabsorção óssea (NAOT; MUSSON; CORNISH, 2019; SRINIVASAN; WONG; KARPONIS, 2020).

Os hormônios esteróides sexuais desempenham papéis essenciais no desenvolvimento e manutenção da arquitetura óssea em homens e mulheres e em diferentes fases da vida. O estrógeno está entre os principais hormônios reguladores do metabolismo ósseo e sua síntese ocorre a partir de conversões

bioquímicas da testosterona (CAULEY, 2015). Seus efeitos são diretos nos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, inibindo a osteoclastogênese pela supressão da produção do RANKL pelos osteoblastos e aumento da síntese de OPG, bloqueando a ação efetiva do sistema RANK/RANKL (KHOSLA *et al.*, 2002; KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012).

Estudos recentes sugerem que o estrógeno também regula a produção de SOST, que é um inibidor da via Wnt (DRAKE; KHOSLA, 2017). Assim, este regulador pode inibir a osteoclastogênese e regular positivamente a osteoblastogênese (KHOSLA; MONROE, 2018).

Além da interação direta e sistêmica de agentes hormonais descritos acima, pode-se ressaltar também a presença de fatores locais que são mediadores da diferenciação osteogênica como citocinas, proteínas e fatores de crescimento (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). Diante de todas as formas de correlações entre sistema imunológico e sistema esquelético, didaticamente essa área é nomeada como osteoimunologia (TAKAYANAGI, 2005).

Como supracitado, o sistema imunológico apresenta uma gama de citocinas dentre elas destaca-se o TGF β . Essa citocina é classificada como pleiotrópica, membro da superfamília dos fatores de crescimento de transformação β e são encontradas em tecidos cerebrais, tecidos cardíacos, pulmonares, no rim, baço, fígado e nos ossos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; DEVESCOVI *et al.*, 2008).

No tecido ósseo, esse fator é secretado em uma forma inativa pelos osteoblastos, pelas células tronco da medula óssea, condrocitos hipertróficos, macrófagos e fibroblastos e liga-se a um peptídeo associado a latência (LAP). Após a clivagem de LAP o TGF β é liberado em sua forma madura, atuando na lacuna de reabsorção de forma autócrina e parácrina (OREFFO *et al.*, 1989; PANAHIPOUR *et al.*, 2021; ZHANG; BEVAN, 2012).

A ativação dos receptores específicos de TGF β induz a fosforilação de proteínas estruturalmente semelhantes que são as principais transdutoras de sinais para receptores da superfamília do TGF β as SMADS 2 e 3 (FENG; DERYNCK, 2005). O TGF β , ao interagir com receptores serina/treonina quinase tipo I iniciam a fosforilação das SMADS que formam complexos entre si e migram para o núcleo celular ativando a transcrição de fatores de transcrição importantes

para a osteoblastogênese como RUNX2 e osterix (CHEN; DENG; LI, 2012; LEE; HONG; BAE, 2002).

As BMPs, são fatores de crescimento multifuncionais membros da superfamília do TGF β e exercem fundamentais papéis na diferenciação osteoblástica além da organogênese, embriogênese crescimento, diferenciação, quimiotaxia e apoptose celular (OLIVEIRA *et al.*, 2017; SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2016). Estas moléculas atuam de forma parácrina, ligando aos seus receptores (BMPR) presentes na superfície celular, fosforilando e ativando uma via sinalizatória por meio de SMADS que equaliza na ativação da transcrição do fator RUNX2 levando, por conseguinte ao processo de osteoblastogênese (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016).

O fator de crescimento fibroblástico (FGF) é um hormônio sintetizado e excretado por osteoblastos e osteócitos, elevando a biologia do tecido ósseo não apenas como a principal fonte de reserva de Ca²⁺ e P, mas como um órgão endócrino que atua de maneira orquestrada e sistêmica na homeostase mineral do organismo (MARTIN; DAVID; DARRYL QUARLES, 2012).

O equilíbrio fisiológico de Ca²⁺ e P é de grande importância biológica para formação e manutenção da qualidade mineral óssea (MURSHED, 2018b). O FGF, afeta diretamente o metabolismo ósseo, assim como as funções celulares e o processo gradual de mineralização (BRANDÃO; VIEIRA, 1999).

2.6 – Tolerância Oral:

A Tolerância Oral (TO) foi descrita de maneira contundente e sistematizada no início do século XX, mais especificamente no ano de 1911, como forma de prevenção da anafilaxia sistêmica, por meio da ingestão prévia da proteína do ovo de galinha e em um outro estudo, pela imunização com injeções de uma proteína do milho (zeína) em cobaias que com hábito dietético a mesma proteína (WELLS, 1911; WELLS; OSBORNE, 1911). Contudo no ano de 1829, Dakin já havia descrito o processo empírico de indígenas americanos, sobre a ingestão de uma planta sensibilizante para prevenção de dermatite alérgica e mais tardiamente, Chase (1946) concluiu que a dermatite de contato poderia ser bloqueada pela administração oral de dinitroclorobenzeno, um produto químico utilizado no processo manual de revelações fotográficas (BUENO; PACHECO-SILVA, 1999; LIMA, 2007).

A partir da década de 70 várias linhas de pesquisas relacionadas à TO passaram a ser objeto de discussões, utilizando-se altas doses de antígenos externos, principalmente a ovalbumina (OVA). O conceito passou a ser de TO frente à supressão da resposta celular e humoral, pela administração oral prévia do antígeno principalmente pela paridade aos efeitos naturais que o organismo desenvolve durante o processo tolerogênico (THOMAS; PARROTT, 1974; VAZ *et al.*, 1977).

O conceito de TO passou a ser caracterizado como diferença da resposta imune sistêmica induzida especificamente pela proteína fornecida oralmente ao organismo (CANTARUTI *et al.*, 2019; FRANCO-VALENCIA *et al.*, 2022; REZENDE; WEINER, 2017). Todavia, Carvalho *et al.*, 2002, afirmam que o conceito deve incluir de maneira sistematizada que o processo tolerogênico é regulatório, ocasionando reatividade imunológica estável e específica após a imunização com antígeno previamente administrado por via oral. Esses mecanismos vem sendo objeto de estudo no desenvolvimento de terapêuticas principalmente para doenças autoimunes e alergias alimentares (RODRIGUEZ-CASTRO *et al.*, 2018; RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020; SAMPSON *et al.*, 2018).

2.6.1 – O TGI como barreira seletiva:

Juntamente com a pele, o intestino de seres vertebrados, são os maiores órgãos de contato com o ambiente externo e interno, respectivamente (REZENDE; WEINER, 2018). A mucosa intestinal humana, tem uma área aproximada de 300 m², constituídos de vilosidades e por microvilosidades, conectando todo o meio interno ao externo, que é abundantemente banhado por uma camada de muco (mucina) e é considerado um sítio orgânico densamente povoado por microorganismos comensais, simbióticos e moléculas derivadas de alimentos ingeridos (MOWAT; AGACE, 2014).

A grande maioria da população bacteriana que constituem a microbiota intestinal, não faz parte da classificação patogênica e estão diretamente relacionadas ao processo homeostático do organismo. Entretanto, há um pequeno percentual com características potencialmente patogênicas e a dieta torna-se um fator determinante para essa distinção entre a colonização intestinal (DE MORAES *et al.*, 2014).

O TGI é exposto diariamente a uma vasta quantidade e variedade de antígenos, por meio da ingestão de proteínas exógenas provindas da dieta (TORDESILLAS; BERIN, 2018). Esse complexo sistema, tem a tarefa desafiadora de tolerar nutrientes estranhos e o microbioma comensal, enquanto exclui ou elimina patógenos ingeridos (ESTERHÁZY *et al.*, 2019).

Especificamente o intestino delgado, apresenta projeções (vilosidades) e depressões (criptas de Lieberkuhn) em sua estrutura, responsáveis pelo aumento da superfície de contato com o bolo alimentar e produção de enzimas, responsáveis pela clivagem de proteínas (antígenos), que fazem parte da cadeia dietética em partículas menores (aminoácidos) para uma melhor eficácia de absorção junto a mucosa intestinal (SHEVACH, 2009; TORDESILLAS; BERIN, 2018; UNTERSMAJR *et al.*, 2005). Entretanto, uma determinada fração de proteínas, pode, de maneira regular, alcançar o sistema imunológico adjacente ao TGI de forma inalterada, realizando a interação com células apresentadoras de antígenos (APCs) (TORDESILLAS; BERIN, 2018; UNTERSMAJR *et al.*, 2005; WAKABAYASHI *et al.*, 2006).

Ao longo do epitélio intestinal, o antígeno e suas partículas, podem ser transportados por quatro vias distintas de absorção, na ausência específica de ruptura da barreira epitelial: pelas células *microfold* (células M), pelas células caliciformes (GAPs), por via paracelular (entre células) e pelas células dendríticas (DCs). A forma de transporte de antígenos, depende principalmente de características como solubilidade, propriedades bioquímicas e diâmetro de cada partícula (FIGURA 10) (KNOOP; MILLER; NEWBERRY, 2013; SPAHN *et al.*, 2001).

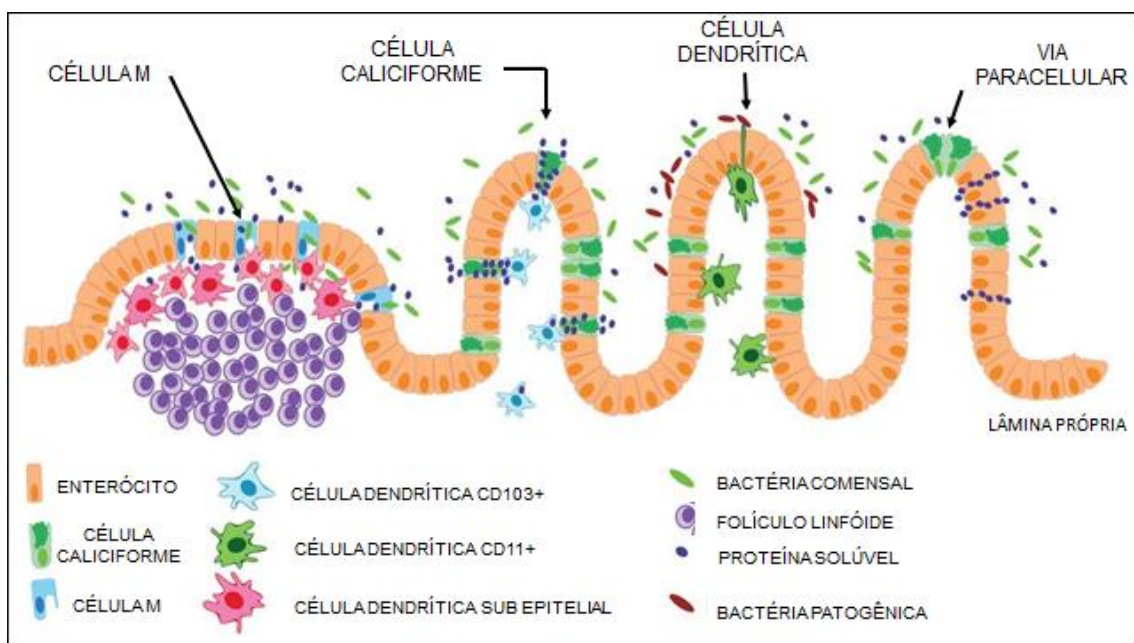


FIGURA 10: Vias de entrega de antígenos transepiteliais. Incorporação de antígenos em diferentes localidades. Fonte: Adaptado de KNOOP; MILLER; NEWBERRY, 2013.

Uma vez que os antígenos são absorvidos ao longo do intestino delgado, sabe-se que anatomicamente na porção íleal há estruturas denominadas Placas de Peyer (PP), sendo constituídas por aglomerado de células linfáticas (MACPHERSON *et al.*, 2008; SHEVACH, 2009). As PP, apresentam formatos ovais e desempenham um complexo sistema de ativação de respostas imunológicas sistêmicas (DOS *et al.*, 2019). Essas estruturas, apresentam células linfáticas do tipo B, responsáveis pela proteção do organismo de infecções e células linfáticas T CD8 reguladoras, com uma ampla variedade funcional, como por exemplo estimulação ou retardamento de outras células de defesa, geradas

pós processo de tolerização após processo de secreção de TGF- β (MILLER *et al.*, 1992; SPAHN *et al.*, 2001).

As células *Microfold* (M) comumente encontradas no epitélio associado ao folículo que recobre as PP, utilizam de pinocitose, macropinocitose e endocitose mediada por receptores específicos para transporte de diminutas partículas solúveis a bactérias intactas, que interagem com DCs que anatomicamente estão dispostas sob o epitélio, na cúpula subepitelial do tecido linfóide ou na lâmina própria (LP) das vilosidades (KNOOP; MILLER; NEWBERRY, 2013).

O conjunto de antígenos que são parcialmente degradados, interagem com as DCs, que capturam as partículas por meio de seus prolongamentos vilosos e migram para os linfonodos mesentéricos, graças a facilitação do receptor fetal (Fc) e são transportados por vesículas bidirecionais de imunoglobulina G (IgG) ou complexos de antígenos induzindo as possíveis diferenciações (JAENSSON *et al.*, 2008; UNTERSMAJR *et al.*, 2005). Essa classe celular (DCs) induzem de maneira expressiva a produção de imunoglobulina A (IgA), um tipo de anticorpo secretado de forma abundante no lúmen intestinal. Esse anticorpo é sintetizado em resposta a uma grande variabilidade de antígenos que realizam a transcitose via células M em condições homeostáticas (KOBAYASHI *et al.*, 2019; MABBOTT *et al.*, 2013; MACPHERSON *et al.*, 2008).

Mcdole *et al.*, (2012), investigaram, uma nova rota de transporte dos antígenos no intestino delgado e observaram a complexa cascata de eventos relacionadas a transcitose de pequenos antígenos solúveis, derivados da porção dietética diária na via GAPs e a manifestação eficiente de respostas de células T reguladores (TRegs).

As TRegs são conhecidas como mediadoras de supressão, graças a ação do ambiente tolerogênico intestinal (HARRISON; POWRIE, 2013; JAENSSON *et al.*, 2008). São classificadas dentro do sistema imune adaptativo, como células CD4+ (T-Helper) e atuam limitando a ativação excessiva dos linfócitos T, reduzindo expressivamente a produção de citocinas pró inflamatórias expressando TGF- β e interferon gama (IFN- γ) que exercem funções regulatórias e fazem a supressão de células Th1, mas não Th2 (CHEN *et al.*, 2009; WHITESIDE, 2012). Dessa maneira, as respostas a antígenos tolerantes no trato gastrointestinal, são

principalmente de um perfil Th2 e Th3, com produção de TGF β (JABRI; ABADIE, 2015; WHITESIDE, 2012).

Morfologicamente, o epitélio intestinal é caracterizado como uma barreira extensa, bastante permeável e seletiva, permitindo a passagem de íons, água, soluto e diminutas moléculas. Essa característica, impede a passagem de maneira passiva de proteínas de maiores densidades para a lâmina própria (NESI; FRANCO; CAPEL, 2020), principalmente pela ação das proteínas de adesão do tipo claudinas que impedem a passagem de moléculas maiores que quatro angstroms. Porém, a via paracelular pode ser ativada quando poros de maiores diâmetros se fundem em razão da expressão de diferentes tipos de proteínas claudinas, permitindo o infiltrado de macromoléculas de carboidratos e proteínas pelo epitélio basal até a lâmina própria. Os antígenos que realizam a transcitose via paracelular, são capturados pelas células dendríticas residentes na lâmina própria iniciando as respostas pela ação direta da Tregs (KNOOP; MILLER; NEWBERRY, 2013; TURNER, 2009).

As DCs são células cujas as principais funções são a fagocitose e a apresentação de antígenos versáteis e potentes, atingindo excelente capacidade migratória para dar partida a respostas imunes do tipo inflamatórias e tolerogênicas protetoras ao organismo através da expressão de altos níveis de complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) aos linfócitos TCD4+ (helper). É ativada pela detecção de sinais ambientais, através de receptores de reconhecimento de padrões intracelulares e receptores de superfície (TAKENAKA; QUINTANA, 2017; WORBS; HAMMERSCHMIDT; FÖRSTER, 2017). Ao longo do intestino delgado, duas populações distintas de DCs colonizam o ambiente: DC103+ que recebem partículas antigênicas das GAPs e estão mais relacionadas a tolerância e as DC11+ que através de projeções dendríticas transepiteliais, são capazes de realizarem a captura de antígenos através do epitélio intestinal e realizar a sua apresentação para as células TRegs com extenso potencial inflamatório (MCDOLE *et al.*, 2012; SATITSUKSANOVA *et al.*, 2018; SUTTI *et al.*, 2015).

Em assistência ao GALT, os linfonodos mesentéricos (MLN), são as maiores estruturas participantes do complexo linfonodos do organismo (PABST; MOWAT, 2012). Induzem primariamente as respostas imunológicas adaptativas inatas,

juntamente com os linfócitos intraepiteliais (IELs), que são de grande maioria células CD8+ e expressam sistematicamente receptor $\alpha\beta$, adquiridos ao longo do mecanismo da tolerância oral (FARIA; WEINER, 2005; JABRI; ABADIE, 2015; PABST; MOWAT, 2012).

Desse modo, as respostas bioquímicas e imunológicas celulares são ativadas no trato gastrointestinal, com maior evidência no intestino delgado, após o contato de antígenos provindo de agentes dietéticos e o organismo pode inclusive, realizar modificações e organizações estruturais da mucosa intestinal e também do tecido linfóide que está interligada a essa mucosa (DA SILVA MENEZES *et al.*, 2003). Contudo, as consequências causadas pela ação proteica ao organismo, não se restringe somente à mucosa intestinal. Esse conjunto de eventos, oferece repercussões de maneira sistematizada ao organismo.

2.6.2 – *Indução da TO:*

Alguns fatores estão diretamente ligados ao sucesso ou ao fracasso do processo tolerogênico. A literatura traz principalmente fatores como: natureza, dose antigênica, tipo de ingestão (voluntária ou por gavagem) e idade cronológica animal (FARIA *et al.*, 1998; FARIA; WEINER, 1999; STROBEL; MOWAT, 1998).

Quanto à natureza antigênica frente ao processo de tolerância Strobel e Mowat 1998, descrevem que todos os antígenos solúveis são de classificação timo-dependentes e conseqüentemente, são capazes de induzirem a TO. A dosagem, assim como a forma de ingestão torna-se importante pelo fato de que o consumo voluntário de doses consecutivas ocorre no padrão dietético normal. Dessa maneira, esse processo torna-se mais eficaz frente à gavagem, provavelmente pelo contato intrínseco do antígeno a regiões linfóides das tonsilas palatinas durante a deglutição (FARIA; WEINER, 1999). Por fim, Vaz *et al.*, (1997), reportam que o processo de TO em camundongos neonatos e/ou senis é mais dificilmente alcançado, o que veio a ser confirmado mais tardiamente por Faria e Weiner, 1999.

Pabst e Mowat em 2012, defendem a importância de diferenciar os efeitos da tolerância a bactérias e a tolerância às proteínas alimentares, uma vez que, ambos processos tolerogênicos estão relacionados a absorção no TGI. Os autores

descrevem que enquanto a tolerância à proteína alimentar resulta em repercussões locais e sistêmicas, a tolerância a bactérias comensais, não chegam a realizarem interferências sistêmicas.

2.6.3 – *Mecanismos de TO:*

Diversas linhas de pesquisas aparecem empenhadas em esclarecer fielmente os mecanismos envolvidos na cinética da TO. A dosagem antigênica ofertada ao sistema imunológico é considerada um dos principais mecanismos envolvidos (CHEN; WEINER, 1996; COMMINS, 2015; MOWAT, 2003). Nesse aspecto, menores doses estão relacionadas com a ativação de TRegs, induzindo uma supressão da resposta imune através de citocinas secretadas e ligadas à superfície celular como IL4, IL10 e TGF β . Ao passo que doses mais elevadas favorecem mecanismos que resultam na diminuição ou inexistência de reações de defesa (anergia) e deleção clonal (FIGURA 11) (FARIA; WEINER, 2005; FRIEDMAN; WEINER, 1994; TORDESILLAS; BERIN, 2018). Entretanto, vale ressaltar que esses mecanismos não são únicos, principalmente quando se trata de dosagens maiores (COMMINS, 2015).

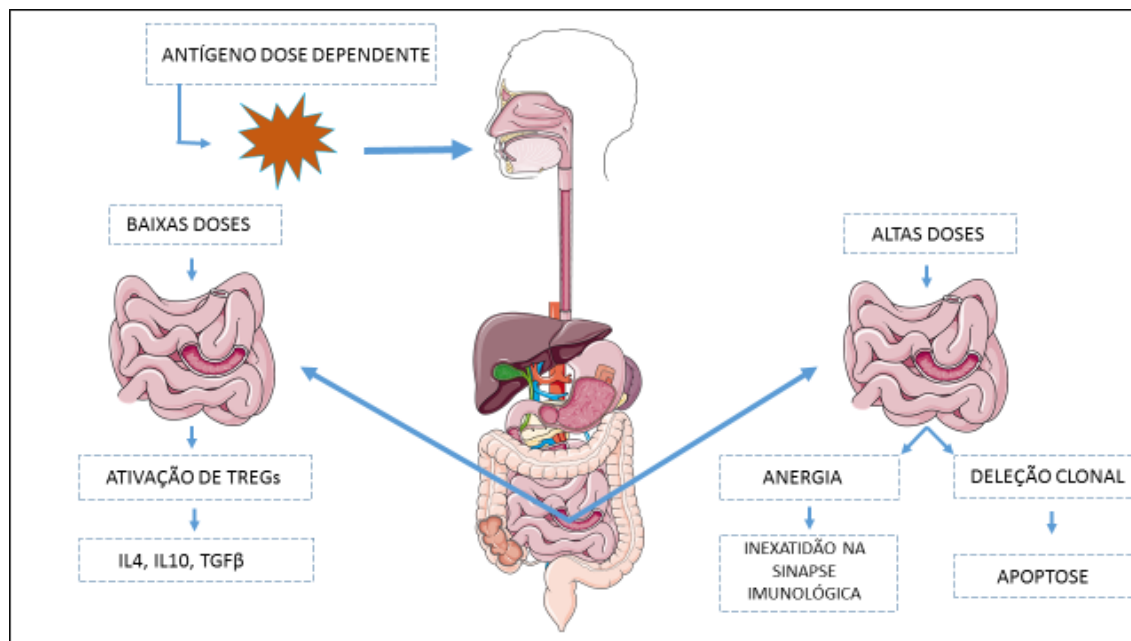


FIGURA 11: Mecanismos de tolerância imunológica. Antígeno proveniente da dieta, torna-se dose dependente para indução da tolerância. Baixas doses ingeridas estão relacionadas com ativação de TRegs, secreção de ácido retinóico, TGF β . Altas doses ingeridas estão relacionadas com anergia e deleção clonal. Fonte: O próprio autor. Imagens: obtidas através do site <https://smart.servier.com>.

Mucida *et al.*, (2007), concluíram que DCs presentes ao longo do intestino delgado, em contato com baixas doses de antígenos, acionam TRegs em uma via de mão dupla com a produção de ácido retinóico que juntamente com o TGF β induzem a diferenciação de células T virgens em células TRegs, inibindo respostas inflamatórias de outras células T, confirmando a hipótese de que todas as classes de TRegs podem ser induzidas e em resultado, ativadas por antígenos provenientes da dieta oral (CHEN *et al.*, 1994; COMMINS, 2015; TSUJI ; MIZUMACHI ; KURISAKI, 2001).

A anergia que se relaciona com as células TRegs é o mecanismo pelo qual a tolerância resulta em linfócitos auto reativos, induzindo a TO por altas doses antigênica (BUENO; PACHECO-SILVA, 1999; MAYER; SHAO, 2004). As células T tolerizadas, agregam-se as APCs, na cinética natural, porém, apresentam inexistência na formação das sinapses imunológicas, diminuindo a secreção de IL-2 e conseqüentemente a proliferação celular (ISE *et al.*, 2005; MIRENDA *et al.*, 2005).

Similar a anergia, a deleção clonal ocorre também quando as concentrações antigênicas se encontram altas e as mesmas dirigem especificamente para as células T, induzindo apoptose de linfócitos (FARIA; WEINER, 2005).

Cabe ressaltar, que a indução da TO não é restrita apenas a componentes pertencentes ao TGI, podendo ser induzida por outras vias como por exemplo a pele e vias aéreas (BROERE *et al.*, 2008; DUNKIN; BERIN; MAYER, 2011; KELLER *et al.*, 2006; VAN DEN BERG *et al.*, 2010).

2.6.4 – Adjuvantes:

Desde a década de 20, estudos demonstram que a associação de adjuvantes como o Hidróxido de Alumínio (Al(OH)_3) a antígenos, gera consideráveis amplificações da produção de anticorpos (MAYER ; SHAO, 2004).

Um dos mecanismos que resultam nessa expansão em decorrência dos efeitos associativos dos adjuvantes, estão intrinsecamente correlacionados com a maturação e migração de APCs frente a suas funções imunológicas de apresentação de antígenos para ativação de linfócitos T, com posterior condução antigênica em direção aos linfonodos pela drenagem linfática aumentando a produção pelos linfócitos B. Outro mecanismo proposto é a formação de depósitos protetivos em que o adjuvante “encoberta” o antígeno de diluição, degradação e eliminação instantânea pelo organismo, resultando em maiores níveis de produção de anticorpos (MCKEE *et al.*, 2005).

Adjuvantes em associação com antígenos protéicos dentro dos efeitos sistêmicos da TO, mostraram-se promissores em experimentos com reparo de feridas incisionais na pele de camundongos tolerizados com ovalbumina (OVA) e posteriormente imunizados com OVA+ Al(OH)_3 por via parenteral imediatamente antes da lesão. Os resultados apontaram diminuição do processo inflamatório na área da lesão e melhora da deposição de colágeno, tornando-o mais próximo da pele intacta (COSTA *et al.*, 2016). Usando um formato distinto de antígeno proteico, Cantaruti *et al.*, 2017 utilizaram a proteína zeína, para tolerizar camundongos machos, associada também ao adjuvante Al(OH)_3 , em um modelo de feridas excisionais no dorso animal. Os resultados apontaram melhora na

cicatrização da pele, aumento do número de leucócitos ativos, bem como aumento significativo de linfócitos T.

2.6.5 – Efeitos Indiretos:

Classicamente, dentro dos estudos imunológicos referente a TO, ela é classificada como evento específico, onde a resposta a ingestão de determinado antígeno, suprime a síntese de anticorpos apenas para o antígeno em questão e não interfere na cinética tolerogênica de antígenos adversos (STROBEL; MOWAT, 1998).

Entretanto, os estudos de Carvalho *et al.*, de 1994 e 1997, afirmam que ao injetar uma proteína via parenteral em animais tolerantes, associado ao adjuvante, a resposta obtida é a redução da responsividade imunológica também para proteínas distintas ofertadas simultaneamente. Esses episódios são classicamente chamados de efeitos indiretos da tolerância oral (CARVALHO; VERDOLIN; VAZ, 1997).

A supressão imunológica para antígenos não específicos mantém correlação íntima com a proteína que foi previamente tolerada e essa situação se dá com uma apresentação antigênica 72h antes do outro antígeno, por vias de apresentações distintas e o resultado imunizante permanece secundariamente, mesmo sem o antígeno tolerado, isso se, a imunização primária for realizada na presença prévia do antígeno tolerado (CARVALHO *et al.*, 1994; CARVALHO; VAZ, 1996; CARVALHO; VERDOLIN; VAZ, 1997).

Clinicamente, a tolerância oral pode auxiliar na prevenção de alergias e doenças autoimunes, reduzindo de maneira sistêmica os processos inflamatórios recrutando e ativando células do sistema imune e citocinas específicas (FARIA; WEINER, 2006; HOSTMANN *et al.*, 2015).

No estudo de Baek *et al.*, (2017), foi demonstrado que a tolerância oral pode prevenir dermatites atópicas. O mesmo fenômeno foi demonstrado de forma experimental em humanos, quando HOSTMANN *et al.*, (2015) usou uma proteína por via oral, após os voluntários terem sido previamente sensibilizados.

Vários estudos apontam a efetiva e concisa interferência dos efeitos indiretos da TO, na cinética inflamatória e reparo em diversos tecidos estudados. No

trabalho de Rodrigues *et al.*, (2006), foi observado que a injeção de OVA em animais previamente tolerados pela mesma proteína, bloqueia a cinética migratória de células para locais com presença de sinais flogísticos. Rodrigues *et al.*, (2006), observaram que a injeção concomitante de OVA e hemoglobina em animais tolerantes a OVA, impediu a peritonite e a produção de eosinófilos pela medula óssea. Mais tarde, Costa *et al.*, (2011), avaliaram a cinética anti-inflamatória no reparo de lesões incisionais na pele do dorso de camundongos tolerantes a OVA, e imunizados com OVA+Al(OH)₃. Observaram redução do tecido de granulação e de miofibroblastos além da similaridade das fibras de colágeno I e III com a pele intacta. E em um elegante estudo de Cantaruti *et al.*, (2017), foi utilizado como antígeno a proteína zeína associada ao adjuvante Al(OH)₃ em feridas excisionais no dorso de camundongos machos. Concluíram que a administração da proteína zeína reduz a infiltração leucocitária e aumenta o número de células T e a expressão do fator de crescimento transformador – β_3 na epiderme recém-formada, resultando na redução de cicatrizes cutâneas.

Esse conjunto de resultados, sugerem que os efeitos indiretos da tolerância oral desencadeada pela injeção parenteral de componentes dietéticos regulares ocorrem de forma sistemática e podem ser explorados como uma forma alternativa de promover a cicatrização de feridas.

Os importantes eventos inflamatórios durante as fases de reparo ósseo para o sucesso da ação, abrem lacunas e questionamentos em relação a (s) hipótese (s) da (s) interferência (s) dos efeitos sistêmicos da TO especificamente nesse tecido. Até o presente momento, não há relatos da correlação entre os efeitos sistêmicos da TO frente ao tecido ósseo. Elaboramos este estudo, em função da necessidade social em ter acesso a terapias efetivas no tratamento de lesões ósseas principalmente no que se diz respeito a terapias dietéticas.

3 OBJETIVOS:

3.1 - Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos sistêmicos da tolerância oral induzida após imunização i.p. por zeína no processo de remodelamento ósseo tardio em tíbias de ratos Wistar machos pós defeito ósseo não-crítico induzido.

3.2 - Objetivos Específicos:

- ❖ Avaliar histomorfometricamente os efeitos da tolerância oral no reparo ósseo 28 e 45 dias após realização de defeito ósseo não crítico.
- ❖ Quantificar a espessura de osso neoformado, número de osteócitos por campo e a formação trabecular na medula óssea no 28° e 45° dia pós-defeito.
- ❖ Analisar os efeitos da tolerância oral nas propriedades mecânicas dos ossos osteotomizados.
- ❖ Avaliar a mineralização do tecido ósseo reparado aos 28 e 45 dias pós-defeito.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 – Animais e ética experimental:

Foram utilizados 120 ratos machos da raça *Rattus Norvegicus Albinus*, da variedade *Wistar* com 12 semanas de idade, obtidos com 3 semanas de vida do Biotério Central da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), transportados em gaiolas beira mar (3 animais por gaiola) em carro particular, com controle de temperatura para o Centro de Bioterismo do Campus Dom Bosco da UFSJ. Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética na utilização de animais (CEUA) da UFSJ sob número de protocolo 9802240321 (ANEXO I).

4.2 - Alojamento e alimentação:

No biotério setorial de animais em experimentação, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, ambiente calmo (FIGURA 12) e em condições de temperatura controladas através de termômetro digital Wester®, que foi acionado a partir do décimo dia experimental e manteve-se média geral de $20,53^{\circ}\text{C} \pm \text{DP } 1,13^{\circ}$ (FIGURA 13) e ciclo 12h (claro/escuro), e se alimentaram integralmente com ração padrão para ratos (Nuvilab CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS, 1985).



FIGURA 12: Alojamento das gaiolas no biotério setorial. Ambiente calmo, higienizado frequentemente, com monitoramento de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e ciclo de 12 h (claro/escuro). As gaiolas eram reposicionadas de forma aleatória 3 vezes por semana objetivando manter a maior linearidade amostral. Fonte: O próprio autor.

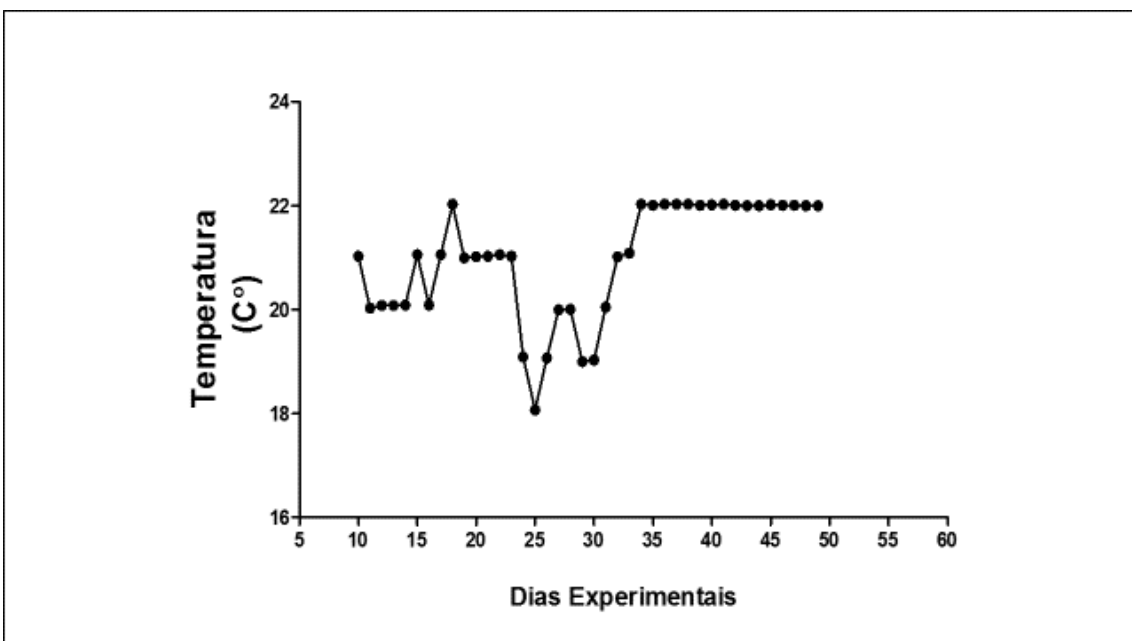


FIGURA 13: Monitoramento da temperatura ambiente. Média geral de $20,53^{\circ}\text{C}$ $\text{DP}\pm 1,13^{\circ}$.

Uma característica fisiológica importante dos roedores é a homeotermia, ou seja, controlam a temperatura corporal independentemente da variação térmica do ambiente, influenciando de maneira direta na sua taxa metabólica basal (POLITI *et al.*, 2008). Variações bruscas de temperaturas podem desencadear estresse e quadros susceptíveis a vários tipos de infecções respiratórias (BALCOMBE, 2006; MIRANDA *et al.*, 2017).

A partir dessa característica fisiológica, somada a chegada da intensa frente fria na macrorregião do Campos das Vertentes no período experimental, foi instalado aquecedor ambiente, no trigésimo quarto dia, estabilizando a temperatura em torno de 22°C objetivando evitar constrições capilares superficiais, piloereção, postura enrodilhada e todos os demais fatores que poderiam impactar no bem-estar animal e no processo de reparo ósseo a ser analisado nesse estudo.

4.3 - Bem-estar animal:

O isolamento de animais de hábitos sociáveis associado a protocolos experimentais também pode ser considerado um fator significativo de estresse moderado perante todo o percurso experimental (RASMUSSEN *et al.*, 2020).

Objetivando minimizar ao máximo os fatores correlacionados a diminuição da qualidade de vida animal, oferecemos para todos os grupos experimentais o enriquecimento ambiental. Foi colocado no interior de cada gaiola, materiais como tubos de plástico PVC, rolos de papéis higiênicos, rolhas inteiriças da própria ração e tampas de garrafas pet (FIGURA 14), uma oportunidade dos animais do estudo demonstrarem seus comportamentos naturais (OLSSON; DAHLBORN, 2002). Isso nos possibilita uma maior confiabilidade dos dados obtidos uma vez que a replicabilidade do habitat natural dos roedores está sendo padronizada nos grupos. Vale ressaltar que animais criados em ambientes enriquecidos apresentam uma menor taxa de alterações comportamentais e fisiológicas causadas por variações que podem ocorrer no interior do biotério e durante o manejo experimental (GARNER, 2005).

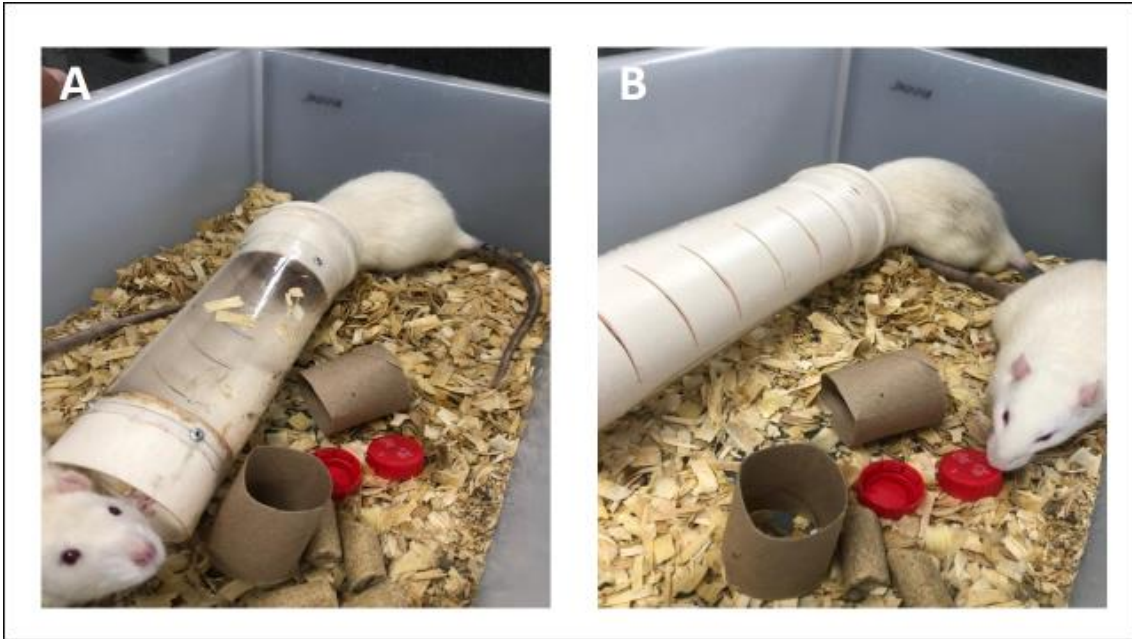


FIGURA 14: Materiais utilizados para enriquecimento ambiental. A) Imagem representativa de tubo de PVC adaptado. B) Imagem representativa da interação dos animais com o material.
Fonte: O próprio autor.

4.4– Delineamento experimental para utilização dos animais:

Dos 120 animais utilizados, 48 ratos foram destinados para análises histomorfométricas (8 animais para cada grupo experimental para ambos períodos de tempo) (QUADRO 1) e 72 ratos para os ensaios biomecânicos (12 animais para cada grupo experimental para ambos períodos de tempo) (QUADRO 2).

Quadro 1: Delineamento para análises histológicas (N = 48 para ambos tempos experimentais).

HISTOLOGIA (N=48)			
Tempo experimental	Zeína	Al(OH)₃	Salina
28 dias	8 animais	8 animais	8 animais
45 dias	8 animais	8 animais	8 animais
Subtotal	16 animais	16 animais	16 animais
		Total	48 animais

Quadro 2: Delineamento para análises biomecânicas (N= 72 para ambos tempos experimentais).

ENSAIO MECÂNICO E DMO (N= 72)			
Tempo experimental	Zeína	Al(OH)₃	Salina
28 dias	12 animais	12 animais	12 animais
45 dias	12 animais	12 animais	12 animais
Subtotal	24 animais	24 animais	24 animais
		Total	72 animais

4.5 - Indução da tolerância oral à proteína Zeína:

A ração NUVILAB fornecida para a alimentação dos animais, continha a proteína zeína em sua composição base e todo número experimental consumiu a fórmula de forma padronizada. Imediatamente antes do procedimento de osteotomia das tíbias direitas, os animais foram divididos em três grupos experimentais e imunizados via i.p. com a proteína zeína diluída no adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ (0,50 ml de 60ug zeína acrescido 9,6 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$) somente com o diluente $\text{Al}(\text{OH})_3$ (9,6 mg) e finalmente com uma solução fisiológica isotônica de NaCl 0,9% em água destilada (solução salina) (9,6 mg). Os grupos de trabalhos e a dosagem oferecida a cada animal experimental, foram configurados da seguinte forma: (FIGURA 15).

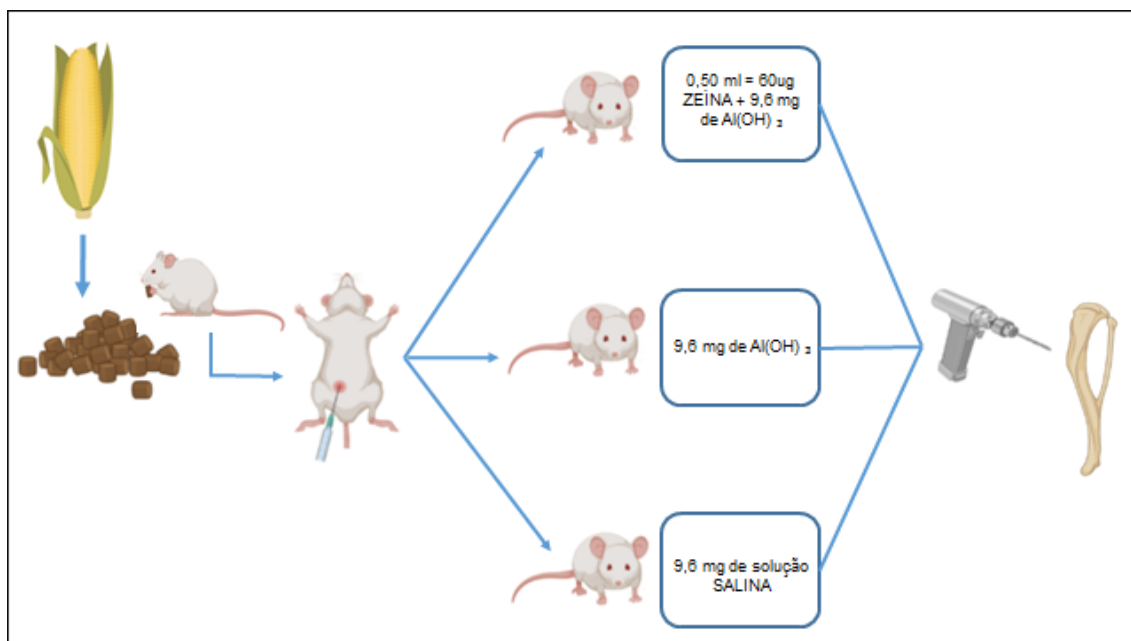


FIGURA 15: Grupos experimentais trabalhados e respectivas doses de imunizações via intraperitoneal. Grupo zeína, grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ e grupo salina. Fonte: O próprio autor. Imagens obtidas através do site <https://biorender.com>.

As eutanásias ocorreram 28 e 45 dias pós procedimento cirúrgico como demonstrado na FIGURA 16.

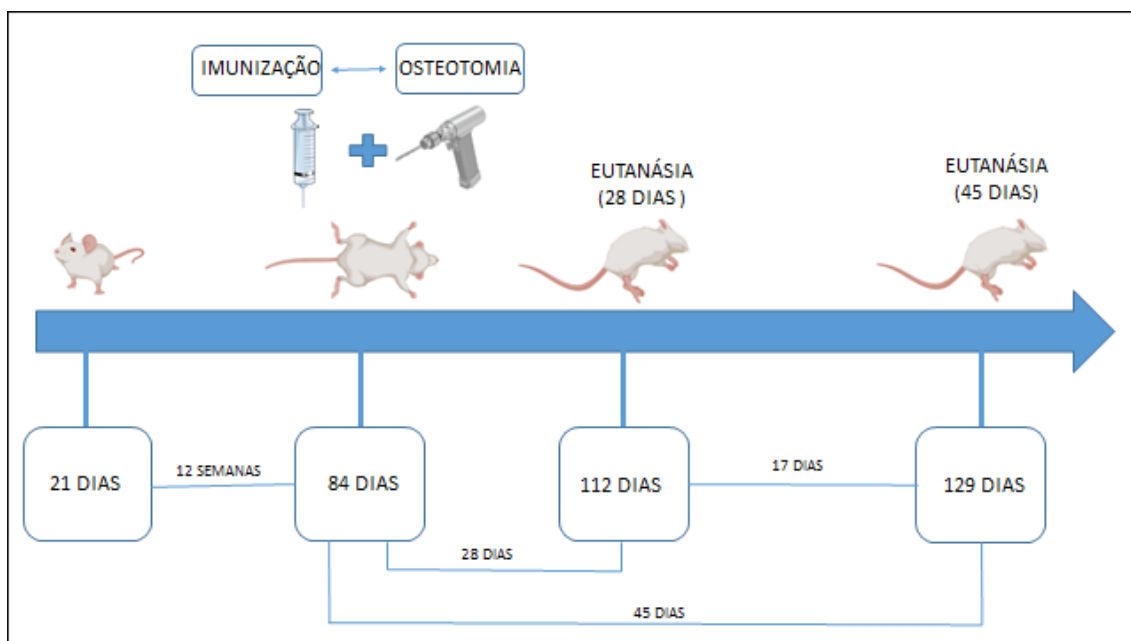


FIGURA 16: Delineamento dos períodos experimentais. 21 dias: Recebimentos dos animais no Centro de Bioterismo da UFSJ. 84 dias: Imunização via i.p. + osteotomia das tíbias direitas. 112 dias: eutanásia do grupo experimental de 28 dias (pós defeito). 129 dias: eutanásia do grupo experimental de 45 dias (pós defeito). Fonte: O próprio autor. Imagens obtidas através do site <https://biorender.com>.

4.6– Osteotomia da Tíbia direita (Defeito ósseo):

Momentos após a imunização foi iniciado o protocolo cirúrgico. Todos animais foram anestesiados com uma associação farmacológica de Xilazina (0,10mg/kg) e Ketamina (0,10mg/kg) via i.p. (FIGURA 17 A), e monitorados de maneira constante a função respiratória para evitar depressão acentuada.

Posteriormente, realizamos a tricotomia e assepsia da região cirúrgica com solução antisséptica de Iodopovidine (FIGURA 17 B).

Para o procedimento incisional, os animais foram mantidos na posição supina, com o membro posterior direito em rotação externa de quadril e tríplice flexão (quadril/joelho/tornozelo). Em seguida, foi determinado o terço médio da tíbia direita. Marcada a linha média, foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm e afastamento da pele para posicionamento com auxílio de afastadores (FIGURA 17 C).

Com o osso exposto, realizou-se a osteotomia parcial de aproximadamente 2,0 mm de profundidade com 2,0 mm de diâmetro utilizando-se uma broca Trefina cilíndrica cortante (0,34 mm (PM 699, Jet® Carbide Burs), acoplada a um motor de baixa rotação (MicroMotor 210/ 105L, Strong®), usado na Odontologia, (FIGURA 17 D/E/F). Esse procedimento foi realizado com irrigação constante de soro fisiológico estéril para neutralizar o aquecimento do osso na área de corte (FIGURA 17 D). Após produzido o defeito ósseo, suturou-se com fio não absorvível - Nylon 4.0 (FIGURA 20G).

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais receberam injeção subcutânea do antibiótico enrofloxacin diluído em solução salina de NaCl (0,2ml/animal). Ainda para evitar proliferação bacteriana e possíveis quadros infecciosos, os animais receberam por três dias 5ml/0,5L de enrofloxacin na água dos bebedouros. Foi administrado também, durante três dias, uma gota de analgésico (dipirona) /animal/dia (FIGURA 17 H). Todos os procedimentos foram baseados em trabalhos como: (ANDRADE *et al.*, 2017; DAYNA *et al.*, 2010).

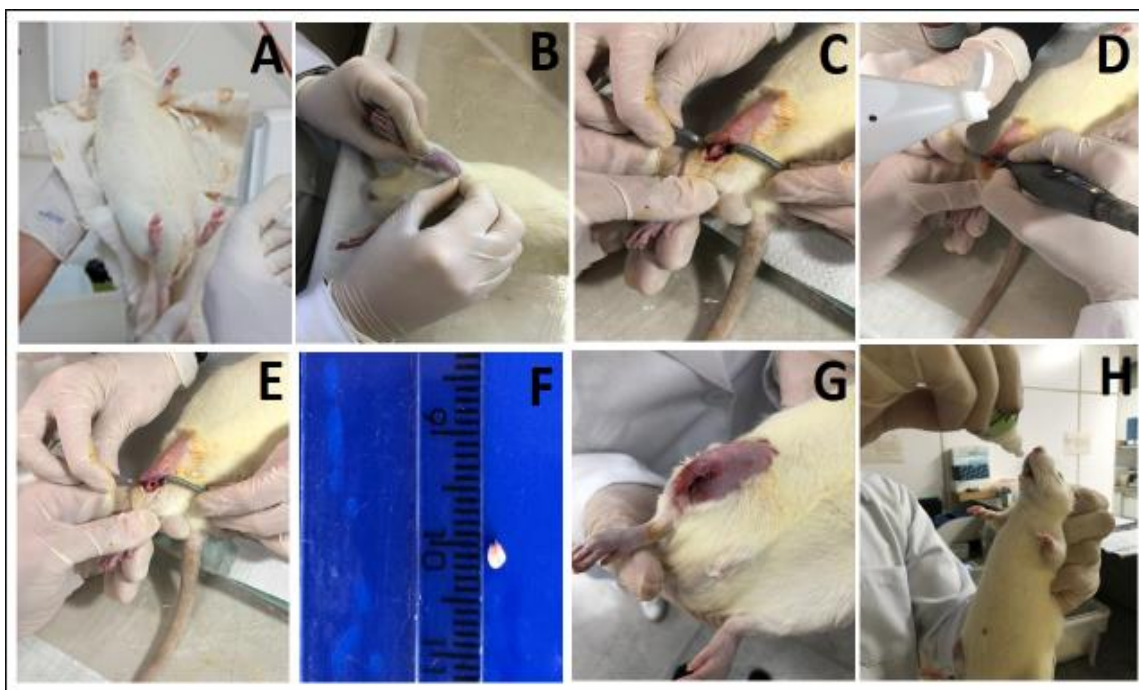


FIGURA 17: Etapas dos procedimentos pré e pós cirúrgicos. A) Anestesia; B) Tricotomia; C) Incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm na pele, na região do terço médio da tíbia direita; D) Realização da osteotomia parcial logo abaixo da tuberosidade da tíbia, de aproximadamente 2 mm, com irrigação constante de soro fisiológico estéril; E) Verificação completa da osteotomia; F) Avaliação do comprimento do fragmento ósseo; G) Sutura da pele com fio Nylon 0.4; H) Administração de analgésico durante três dias consecutivos pós procedimentos cirúrgicos. Fonte: O próprio autor.

Nos dias subsequentes aos procedimentos cirúrgicos, os animais experimentais foram avaliados quanto a variáveis ganho de peso, ingestão de ração, análise da marcha e comportamento social, objetivando evitar perdas do número de amostras e diminuição ao máximo de sofrimento animal.

Após a eutanásia e a dissecação estrutural das amostras biológicas, todo material foi pesado em balança de precisão marte® e as tíbias foram medidas em comprimento e diâmetro com auxílio do paquímetro analógico ZAAS-PAQ6®. As tíbias também foram fotografadas por aparelho celular Iphone X, 458 megapixels (PPI), a uma altura de aproximadamente 20 cm (FIGURA 18).



FIGURA 18: Imagem fotográfica representativa da tíbia direita de rato *wistar* após eutanásia. Área da lesão apontada pela seta preta. Fonte: O próprio autor.

O conjunto de materiais destinados para o exame de densitometria óssea (DMO) e ensaios biomecânicos foram envoltas em gaze cirúrgicas, embebidas em solução salina e congeladas em -20°C para manter hidratação e as características biomecânicas do tecido (HOYER; LIPPERT, 1982). O material destinado para análises histológicas, seguiu os processos a seguir:

4.7 – Processamento Histológico:

Imediatamente após fotografias, todo material foi submetido ao processo de fixação por formalina de millong modificada pH 7.2 por 24 horas. Esse processo visa impedir a liberação e ação de enzimas líticas (autólise) prevenindo a perda de tecido e/ou biomoléculas de interesse (WEBSTER *et al.*, 2009).

4.7.1 - Descalcificação óssea por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA):

Foi utilizado 200 g de EDTA sal dissódico (Synth® ácido P.A.), fórmula química $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ massa molar 372,24 g/mol, dissolvido em 1,5 litro de água deionizada aquecida com auxílio de um agitador acoplado em um aquecedor

eletromagnético (THELGA®) até 50 °C, com auxílio de um termômetro analógico (INCOTERM L-054/07®). O pH foi corrigido para 7,2. Após correção, o volume foi completado para um total de 2 litros, utilizando a mesma água deionizada inicial.

Todo material foi submerso na solução quelante e o conteúdo líquido foi trocado a cada 3 dias (segundas, quartas e sextas feiras) durante os primeiros 45 dias. Após esse período, as epífises proximais foram removidas e o material foi novamente submerso a solução por mais 27 dias, totalizando 72 dias até a completa descalcificação. Utilizamos uma agulha para seringa descartável (20 x 0,55) para classificação da ação do descalcificador. Após a descalcificação completa, todo material foi lavado em água deionizada para completa remoção do EDTA.

4.7.2 – Inclusão, microtomia e coloração:

Com o material totalmente descalcificado, lavado e parcialmente seco em papel toalha, foi feita a desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes por 30 minutos cada (70%, 80%, 90%, e 100%). Subsequentemente a diafanização em 3 banhos de xilol por 20 minutos cada, infiltração em 3 banhos de parafina + xilol em 60°C (em estufa) por 1 hora e inclusão dos fragmentos em parafina virgem (60°C) no plano transversal.

Os blocos de parafina foram seccionados em cortes seriados de 5 µm partindo da borda seccionada da lesão em direção ao lado oposto. Em seguida foi realizada a coloração H&E e Tricômico de Gomori.

4.7.3 - Análise morfométrica em microscopia de luz:

As análises morfométrica foram realizadas com auxílio do microscópio óptico comum (Olympus BX51®) acoplado ao sistema de aquisição de imagens MOTICAM 2000® (2.0 Mpixel) e as mensurações para análises quantitativas foram realizadas por meio do software ImageJ® (<https://imagej.nih.gov/ij>).

Foram realizadas as seguintes análises:

- Análises qualitativas, realizadas através de um escore elaborado, utilizando os parâmetros definidos no QUADRO 3.
- Contagem de osteócitos por área pela objetiva de 40x. Foram obtidas 10 imagens de campos aleatórios na área do defeito, padronizados conforme (FIGURA 19). Posteriormente, calculada a média do número de osteócitos por campo, com divisão pela área total do campo analisado, obtendo o resultado da densidade de osteócitos / μm por campo.
- Mensuração da área trabecular formada na região da medula durante os respectivos períodos experimentais.
- Mensuração da espessura do osso neoformado durante os respectivos períodos experimentais.

Quadro 3: Legenda do score patológico para comparação do reparo das lesões ósseas entre os grupos experimentais:

SCORE DO REPARO	TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO	INFILTRADO TRABECULAR	TECIDO CONJUNTIVO	INFILTRADO INFLAMATÓRIO
-	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
+	Mínimo	Mínima	Mínimo	Mínimo
++	Pouco	Poucas	Pouco	Pouco
+++	Médio	Médias	Médio	Médio
++++	Elevado	Elevadas	Elevado	Elevado
+++++	Regenerado	Exacerbado	Exacerbado	Exacerbado

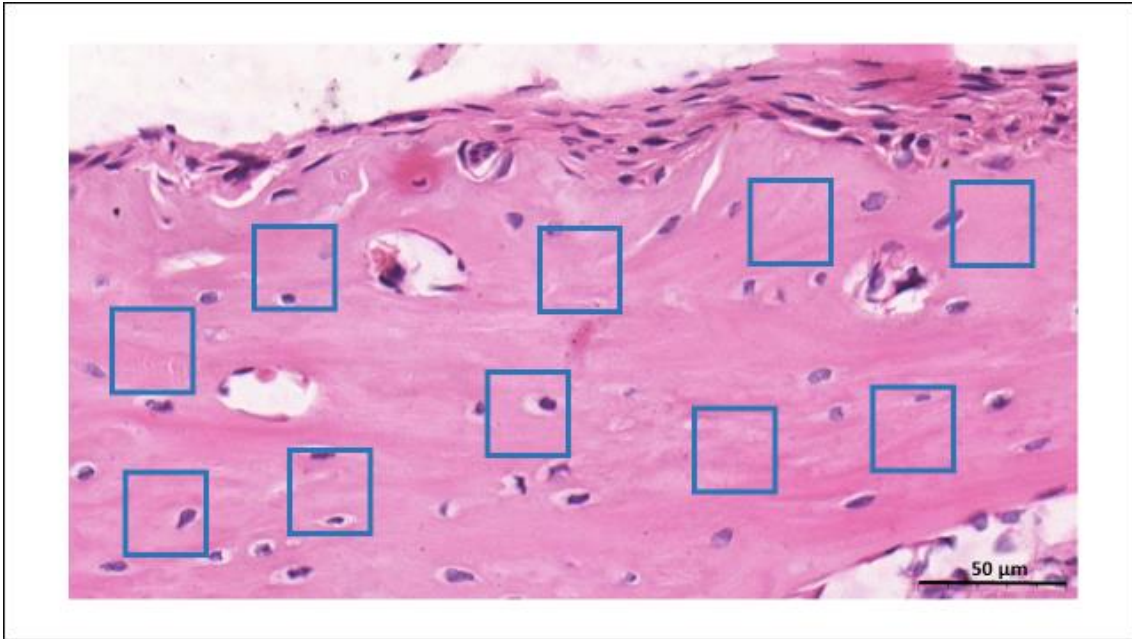


FIGURA 19: Padronização de áreas para a contagem de osteócitos. Corte transversal de tíbia de rato *Wistar* na região do reparo de defeito ósseo corado em H&E. Fonte: O próprio autor.

Para elaboração das pranchas histológicas, realizamos scanner digital das lâminas representativas de cada grupo em ambos períodos experimentais, com apoio e colaboração da professora Dr.^a Cláudia Rocha Carvalho (UFMG/UFSJ) e o Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da Universidade Federal de Minas Gerais (CAPI/UFMG). Posteriormente, as imagens em seus respectivos aumentos, foram capturadas através do software de microscopia digital 3DHistech® (<https://www.3dhistech.com/>).

4.8 – Análises Mecânicas Ósseas:

4.8.1. Densitometria Mineral Óssea (DMO):

Cerca de 24hs antes das análises experimentais, o material que permanecia congelado foi transferido para refrigerador convencional (10°C) para degelo gradual, preservando as características fisiológicas do tecido. Posteriormente, todo material foi deixado por 2 horas (média) em temperatura ambiente para que pudessem entrar em equilíbrio térmico com o meio (HOLANDA; VOLPON; SHIMANO, 1999).

As análises densitométricas e mecânicas foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) em colaboração com o professor Dr. Antônio Carlos Shimano.

A densitometria foi realizada por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios X (Lunar®, modelo DPX-IQ, USA) (FIGURA 20 A). As tíbias direitas foram acomodadas com o defeito ósseo voltado para cima e imersas sob profundidade de 2 cm de solução salina em um recipiente plástico (FIGURA 20 B). Para estabilizar o posicionamento durante o exame, as tíbias foram fixadas com cera ortodôntica em sua extremidade distal de modo que as incidências dos raios-X foram padronizadas no sentido medial-lateral.

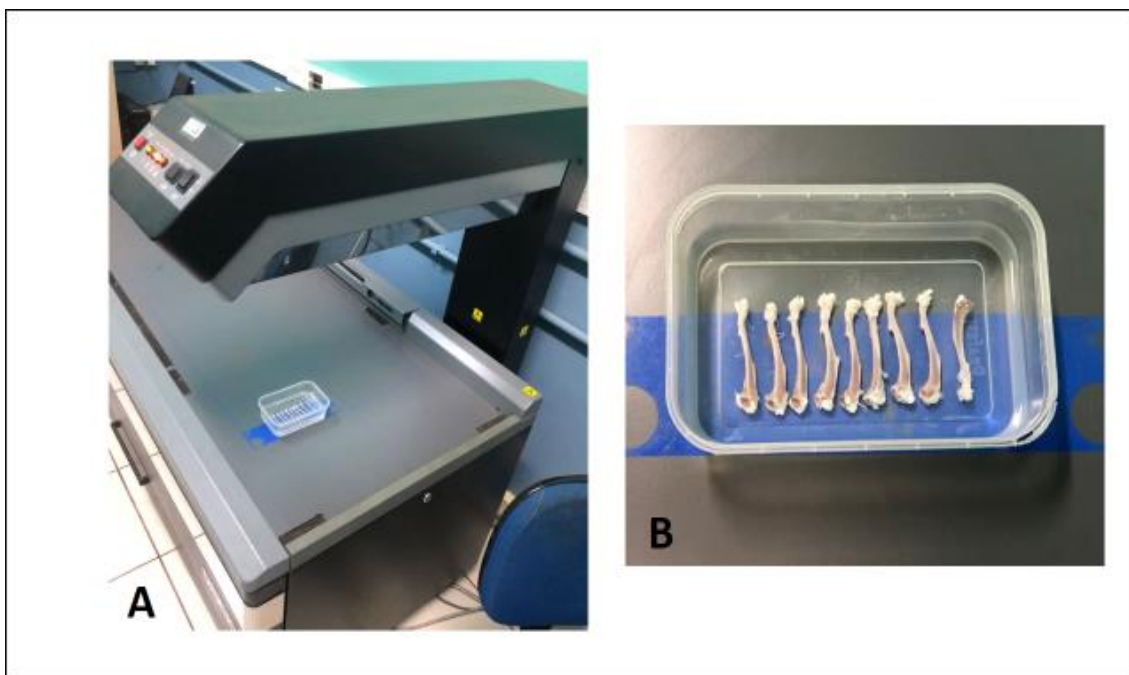


FIGURA 20: Análise de Densitometria Óssea. A) Densitômetro de dupla emissão de raios X (Lunar®, modelo DPX-IQ, USA). B) Tíbias acomodadas em recipiente plástico e cobertas por 2 cm de solução salina. Fonte: O próprio autor.

Usando a ferramenta de seleção manual, os ossos foram demarcados na região de interesse do objeto (ROI), exatamente ao ponto do defeito (FIGURA 21 A), com área padronizada de $0,074 \text{ cm}^2$, colhendo as informações de conteúdo mineral ósseo/g (CMO) e densidade mineral óssea/g cm^2 (DMO) (FIGURA 21 B). Todo protocolo foi realizado conforme Yanagihara *et al.*, (2015).

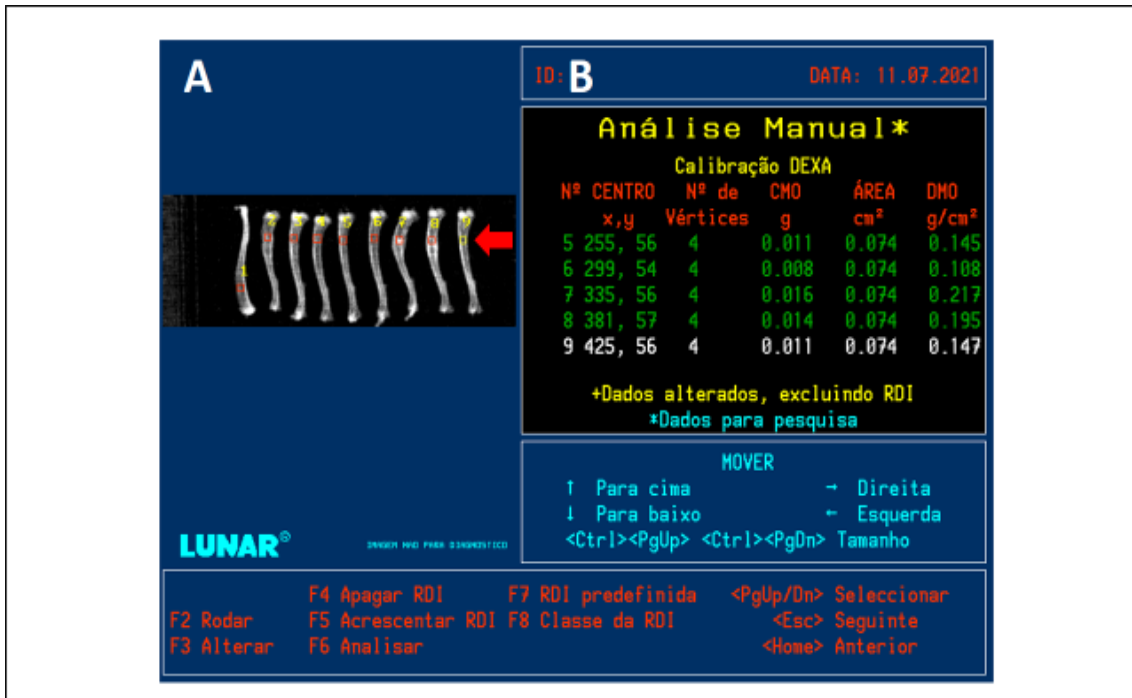


FIGURA 21: Interface do software Lunar® utilizado para a densitometria mineral óssea. A) Região de interesse (ROI) apontada pela seta vermelha. B) Dados obtidos por meio da análise do ROI. Fonte: O próprio autor.

4.8.2 – Ensaio de flexão em três pontos do tipo cisalhamento:

As tíbias direitas (defeito), foram encaminhadas para o ensaio de cisalhamento. O cisalhamento ocorre quando duas forças atuam de forma paralelas uma à outra, porém, em linhas distintas (FIGURA 22) (COLE; VAN DER MEULEN, 2020).

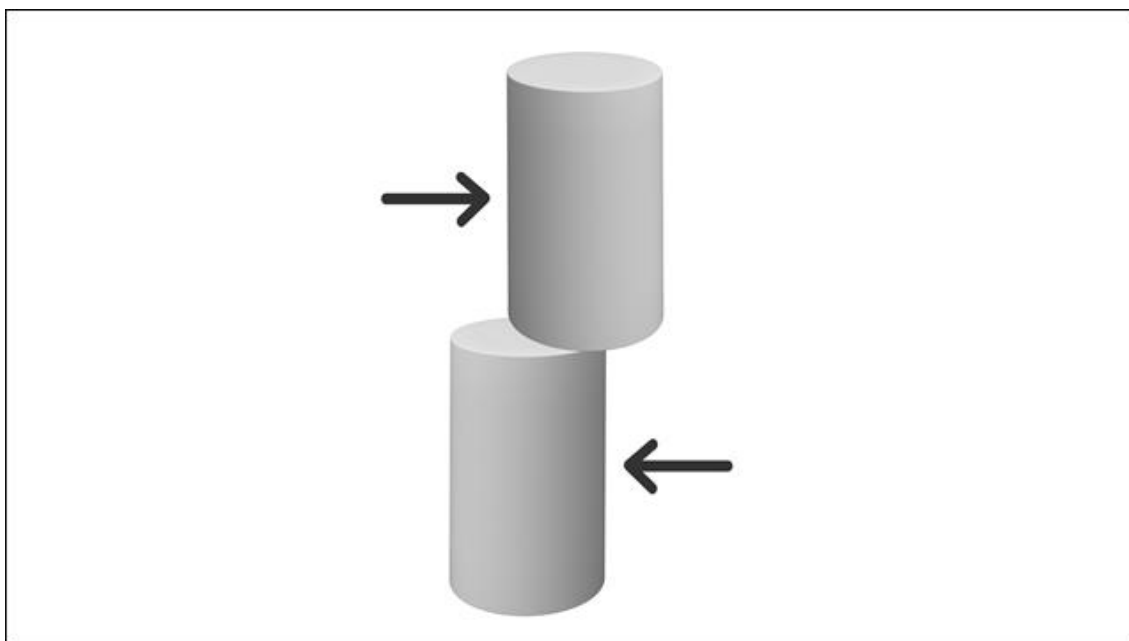


FIGURA 22: Representação esquemática da força de cisalhamento agindo de forma paralelas em um corpo de prova, porém em linhas distintas. Fonte: Próprio autor.

Para realização desse experimento, as tíbias que permaneceram hidratadas em solução salina, foram incluídas em sua extremidade distal em resina acrílica polimetilmetacrilato, utilizando pó polímero metil etil metacrilato (AutoCril®, Brasil) e líquido monômero metil metacrilato autopolimerizante (Jet®, Brasil) (FIGURA 23 A). A inclusão do material fornece suporte e apoio para a fixação na morsa de bancada, presa na máquina universal de ensaios (SHIMANO; VOLPON, 2009; SHIMANO *et al.*, 2014). Logo após, com auxílio de uma lixadeira elétrica, espículas adjacentes foram removidas, objetivando a padronização e o melhor encaixe na morsa (FIGURA 23 B). Novamente, a parte proximal dos agora corpo de prova, foram enovelados em gaze e umedecidos com solução salina (FIGURA 23 C).

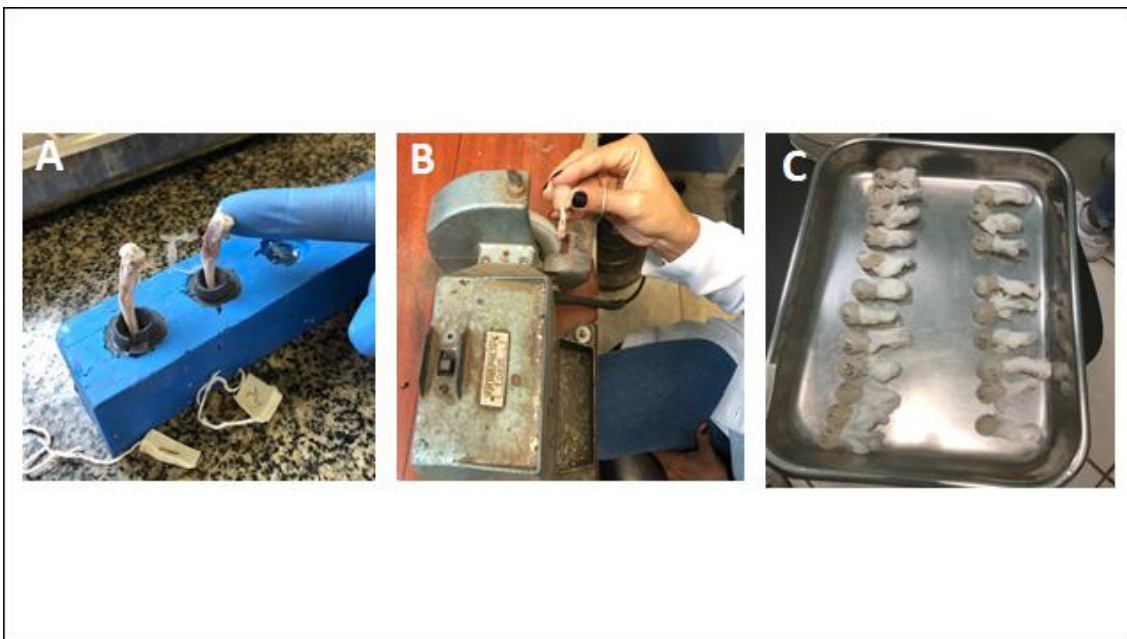


FIGURA 23: Inclusão das tíbias direitas (defeito) em resina acrílica de polimetilmetacrilato para ensaio mecânico de flexão em três pontos do tipo cisalhamento. A) Posicionamento das tíbias de forma padronizada. B) Uso de lixadeira elétrica para polimento das regiões espiculares da resina. C) Resina seca e extremidade proximal das tíbias envoltas em gazes embebidas com solução salina para manutenção da hidratação óssea. Fonte: O próprio autor.

Para o ensaio quase estático de flexão em três pontos do tipo cisalhamento, foi utilizada a Máquina Universal de Ensaio (EMIC®, Modelo DL 10.000, Brasil), com uma célula de carga com capacidade de 500 N. As tíbias foram fixadas pela extremidade distal na morsa (FIGURA 24 A/D) e a aplicação da força foi realizada na extremidade proximal, distante 8 mm do centro do defeito (FIGURA 24 B). O ponto de apoio foi posicionado na região central do defeito, do lado oposto, de modo que o defeito ficasse voltado para cima (FIGURA 24 C). A força foi aplicada na extremidade proximal da tíbia, no sentido medial-lateral, com velocidade de 5 mm/min, fazendo com que a face externa do defeito fosse submetida a um carregamento de tração. O tempo de acomodação foi de 30 s com pré-carga de 10 N.

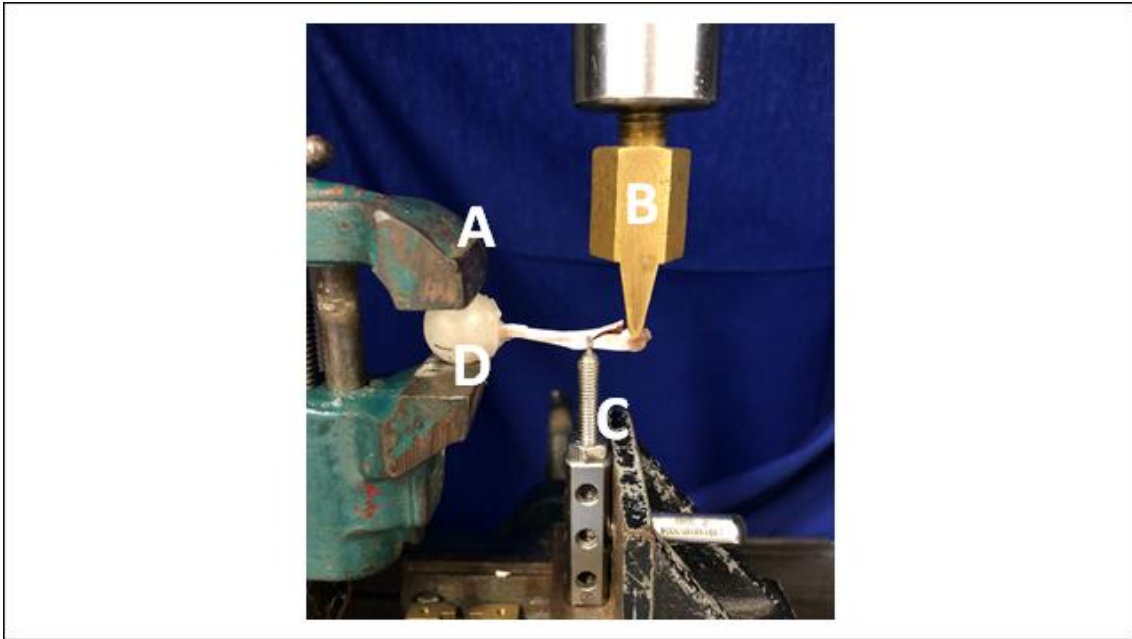


FIGURA 24: Tíbia incluída em Resina Acrílica Autopolimerizável posicionada para o ensaio biomecânico de cisalhamento, no aparelho EMIC, modelo DL/1000. A) Fixação na morsa. B) Acessório de aplicação de força. C) Suporte de apoio. D) Extremidade distal da tíbia incluída em resina acrílica. Fonte: O próprio autor.

Foi utilizado o programa Tesc® (versão 13.0, EMIC®, Brasil) utilizado para coletar valores numéricos (FIGURA 25) e gerar gráficos de força *versus* deformação para cada ensaio e obter as propriedades mecânicas de força máxima (N), rigidez relativa (N/mm) e deformação (mm) (FIGURA 26).

4.8.3 – Ensaio de Flexão em três pontos do tipo bi-apoiado:

A literatura demonstra que a tolerância oral, reflete seus efeitos de forma indireta no organismo, modulando respostas imunes que, por sua vez estão intimamente correlacionadas com o nicho celular ósseo e suas respectivas atividades fisiológicas (COSTA *et al.*, 2016; TSUKASAKI; TAKAYANAGI, 2019).

Partindo da hipótese que as células ósseas podem alterar sua cinética de ação, em decorrência ao fator sistêmico da tolerância oral, decidimos avaliar mecanicamente as tíbias esquerdas (intactas) dos animais do grupo de 45 dias pós lesão utilizando o ensaio biomecânico de flexão em três pontos.

Tecnicamente, esse modelo de ensaio consiste em uma estrutura apoiada em dois pontos equidistantes, com aplicação de carga no centro da distância entre os pontos de apoio iniciais (BIAŁY *et al.*, 2020; YANAGIHARA *et al.*, 2016).

Mecanicamente, essa modalidade de ensaio, provoca a flexão do corpo de prova até o seu ponto máximo de ruptura (FIGURA 27), fornecendo dados quantitativos de deformação (mm), força máxima aplicada (N) e rigidez (%) do corpo de prova testado (SCHMITT *et al.*, 2018).

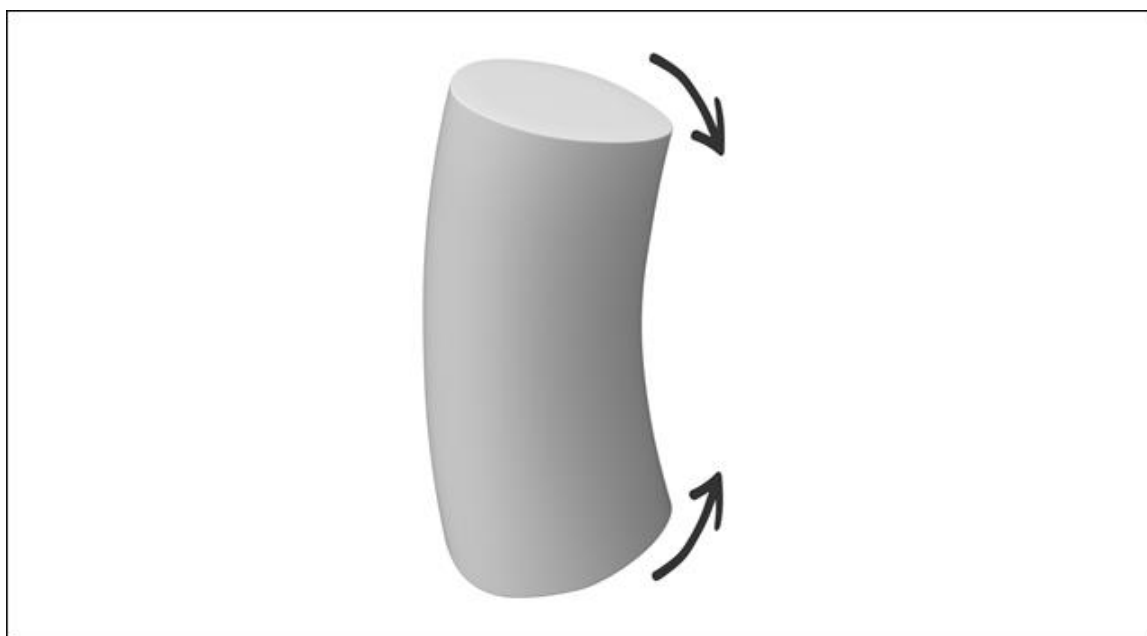


FIGURA 27: Representação esquemática das forças de flexão agindo em um corpo de prova.

Fonte: Próprio autor.

Foi utilizado a mesma máquina de ensaios do experimento em flexão biapoiada com alterações estruturais. Dois pontos de apoios foram fixados na base do aparelho, contendo uma extremidade profunda ao centro do ponto para posicionamento padronizado do corpo de prova (FIGURA 28 A). As tíbias foram acomodadas de forma que a força fosse aplicada na diáfise central, no sentido ântero posterior em uma velocidade de 1mm/min. A distância entre os pontos de apoio foi de 30 mm e foi adotado um tempo de acomodação de 30 segundos (FIGURA 28 B) (FALCAI *et al.*, 2015; YANAGIHARA *et al.*, 2015).

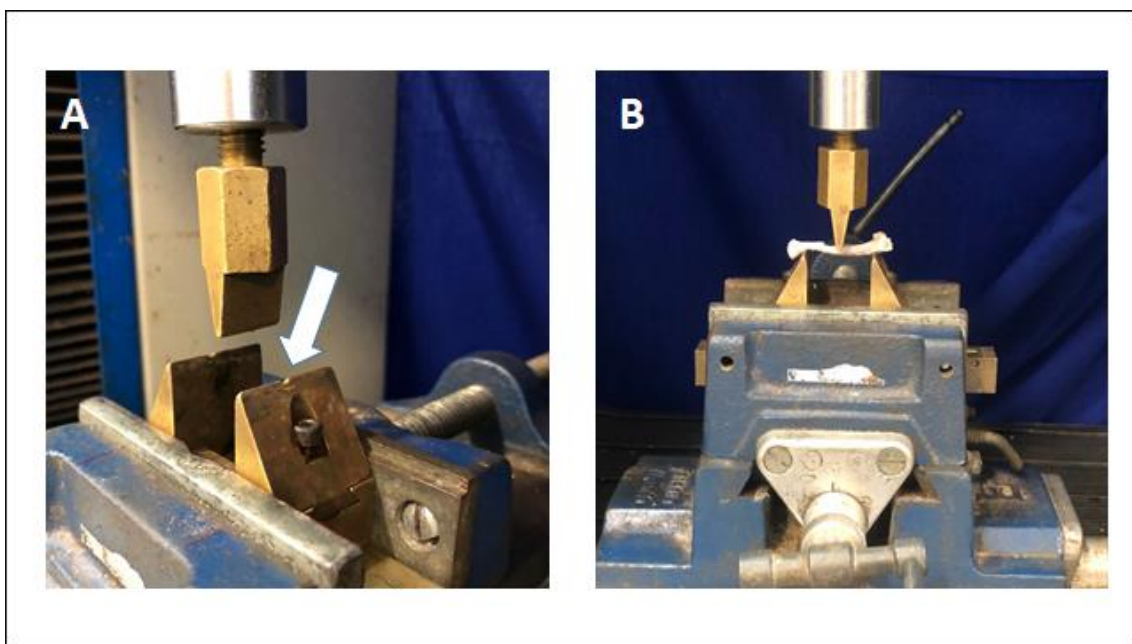


FIGURA 28: Ensaio de flexão em três pontos em tíbias esquerdas (intactas). A) Estrutura contendo pontos de apoio para acomodação do corpo de prova. B) Tíbia esquerda (intacta) posicionada para o início do ensaio. Fonte: O próprio autor.

Os valores finais de cada tíbia testada, são capturados pelo mesmo *software* do ensaio de cisalhamento bem como o padrão de plotagem de gráficos de força (N) *versus* deslocamento (mm).

5.0 - Apresentação dos dados e estatística:

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. Foi realizado o teste de normalização dos dados. A análise estatística dos resultados foi determinada por análise de variância- ANOVA seguido pelo pós-teste de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações, com aceite de significância para ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism® versão 5.01.

6.0 – RESULTADOS:

6.1 – Aspectos gerais em relação a saúde animal:

Para avaliação dos possíveis impactos de estresse/dor gerado na saúde dos animais experimentais, assim como a variável redução da mobilidade que poderia afetar nos resultados, realizamos o ganho ponderal de peso dos animais 1 vez por semana pela manhã, (FIGURA 29). Foi verificado que mesmo após o procedimento cirúrgico (semana 12), os animais permaneceram ganhando peso não causando alterações nas curvas.

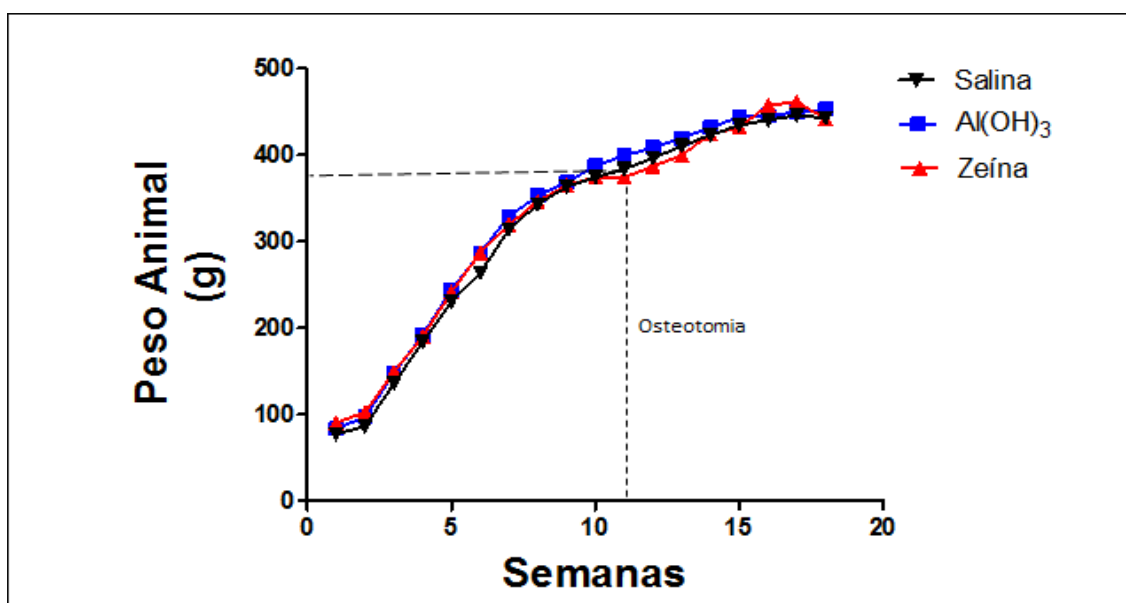


FIGURA 29: Representação gráfica do ganho de peso dos animais ao longo de todo período experimental. O protocolo experimental como um todo, não afetou o ganho de peso animal. Média de peso final grupo Al(OH)₃ 453,07g DP± 16,15g, média peso final grupo zeína 441,83g DP± 28,65g, média peso final grupo salina 442,60g DP±30,36g.

As características nutricionais dos animais, incluindo uma dieta palatável, que forneça as demandas nutricionais e comportamentais adequadas podem influenciar de maneira direta no seu crescimento, nos níveis de bem-estar e consequentemente em sua longevidade durante todo processo experimental (MATTARAIA; MOURA, 2012).

Para verificação da correlação entre ingestão alimentar, ganho de peso e possíveis interferências em relação ao estresse animal, monitoramos também o consumo alimentar (FIGURA 30). Foi observado uma similaridade na ingestão alimentar nos três grupos experimentais. Esse fato, reforça que não houve estresse/sofrimento animal, assim como interferência alimentar após a administração do antígeno zeína absorvido ao adjuvante $Al(OH)_3$, além da não alteração do padrão da locomoção dos animais na gaiola pós os procedimentos cirúrgicos.

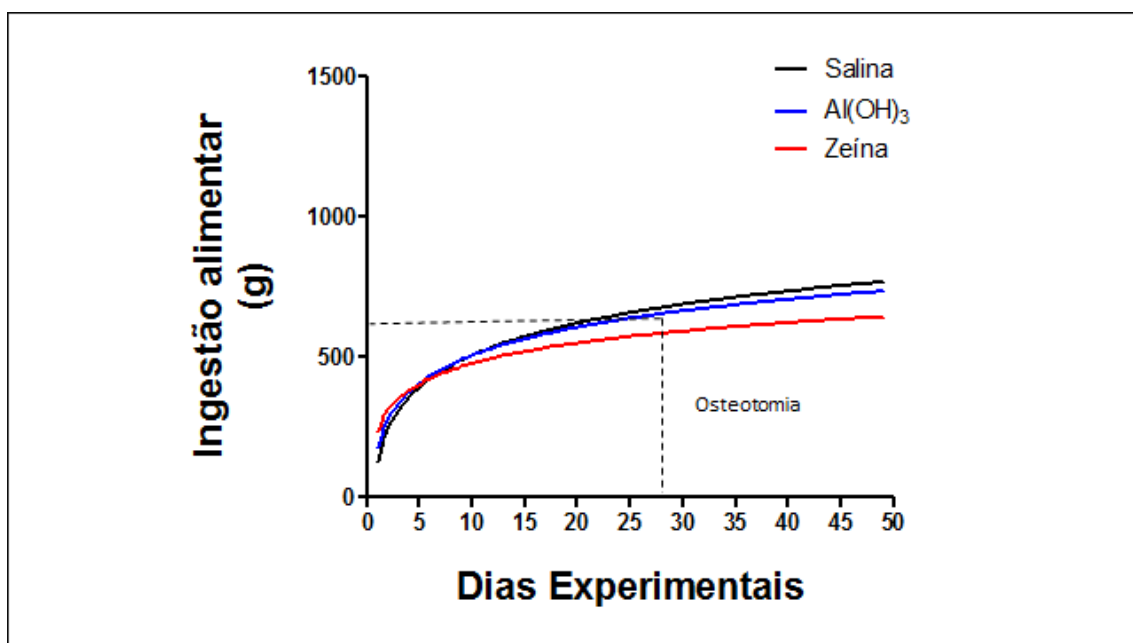


FIGURA 30: Representação gráfica da ingestão alimentar ao longo dos períodos experimentais. Média de ingestão da última semana experimental do grupo $Al(OH)_3$ 775,74g DP± 171,54, média de ingestão da última semana experimental do grupo zeína 677,06g DP± 174,13g, média de ingestão da última semana experimental do grupo salina 826,34g DP±187,99g.

A fim de analisar os possíveis efeitos das diferentes imunizações na tibia submetida ao processo de defeito ósseo, avaliamos o peso das tíbias (defeito e intactas) nos grupos estudados.

Os resultados apontam que a imunização com a proteína zeína e não interfere no peso das tíbias direitas, quando comparados ambos períodos experimentais (28 e 45 dias pós defeito) (FIGURA 31 A). Entretanto, houve diferença significativa de peso nas tíbias esquerdas em todos os grupos pesquisados, comparando o

mesmo intervalo de tempo (28 e 45 dias) pós lesão (GS $p \leq 0,001$ GA $p \leq 0,001$ e GZ $p \leq 0,05$) (FIGURA 31 B).

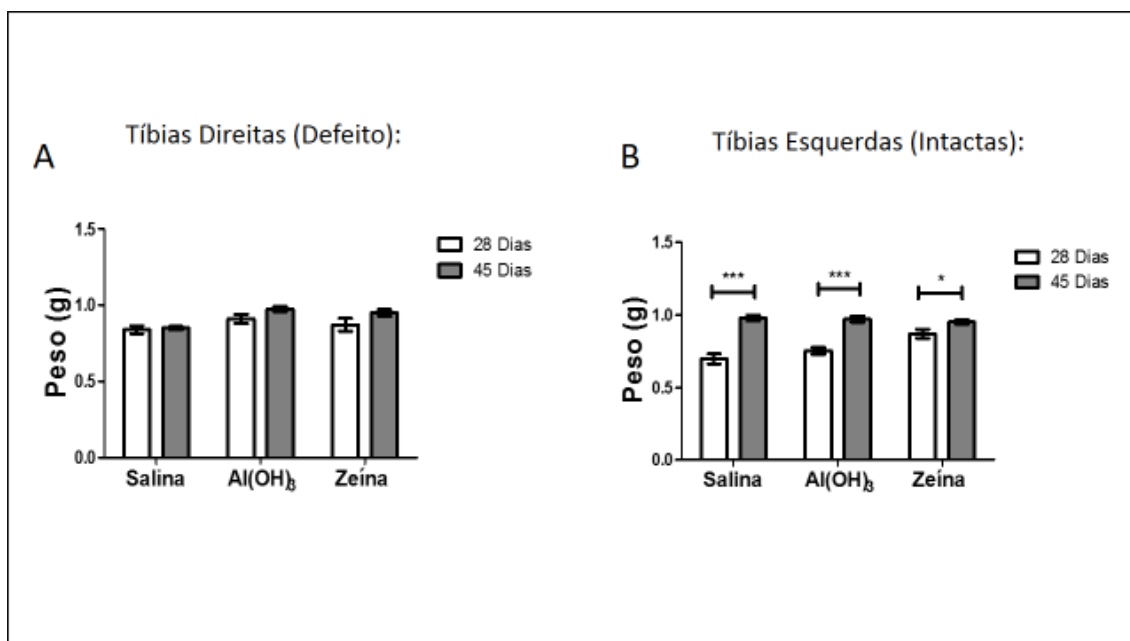


FIGURA 31: A imunização com zeína absorvida em adjuvante Al(OH)₃, não interfere no peso das tíbias lesionadas no período de 28 e 45 dias após o defeito ósseo. A) Tíbias direitas (defeito) com média geral do peso 28 dias: 0,81g, DP± 0,28g, 45 dias: 0,91g, DP±0,05g B) tíbias esquerdas (intactas) com média geral do peso 28 dias: 0,77g, DP± 0,08g, 45 dias: 0,92 g DP± 0,05g. Os dados representam a média ±SEM, sendo * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. Para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, n= 6 para 28 dias e n = 12 para 45 dias.

Compensações posturais associadas a alterações de marcha, pós procedimentos cirúrgicos de patas traseiras, podem acarretar uma maior sobrecarga nas patas dianteiras, alterando por completo a biomecânica da marcha do animal (JU *et al.*, 2012; YANAGIHARA *et al.*, 2016).

Frost (2003), propõe que os ossos podem apresentar alteração de massa óssea como forma de adaptação a diferentes sobrecargas mecânicas, portanto, podem ocorrer alterações no peso dos membros inferiores e superiores do animal submetidos a procedimentos cirúrgicos. Sendo assim, foi avaliado o peso de úmeros dos animais e verificar se houve alguma correlação entre os períodos de 28 e 45 dias após processo de defeito ósseo. Encontramos diferenças significativas entre todos os grupos analisados entre ambos períodos de tempos

experimentais (Úmeros direitos: GS $p \leq 0,05$, GA $p \leq 0,01$, GZ $p \leq 0,01$; Úmeros esquerdos: GS $p \leq 0,001$, GA $p \leq 0,001$, GZ $p \leq 0,001$) (FIGURA 32 A/B).

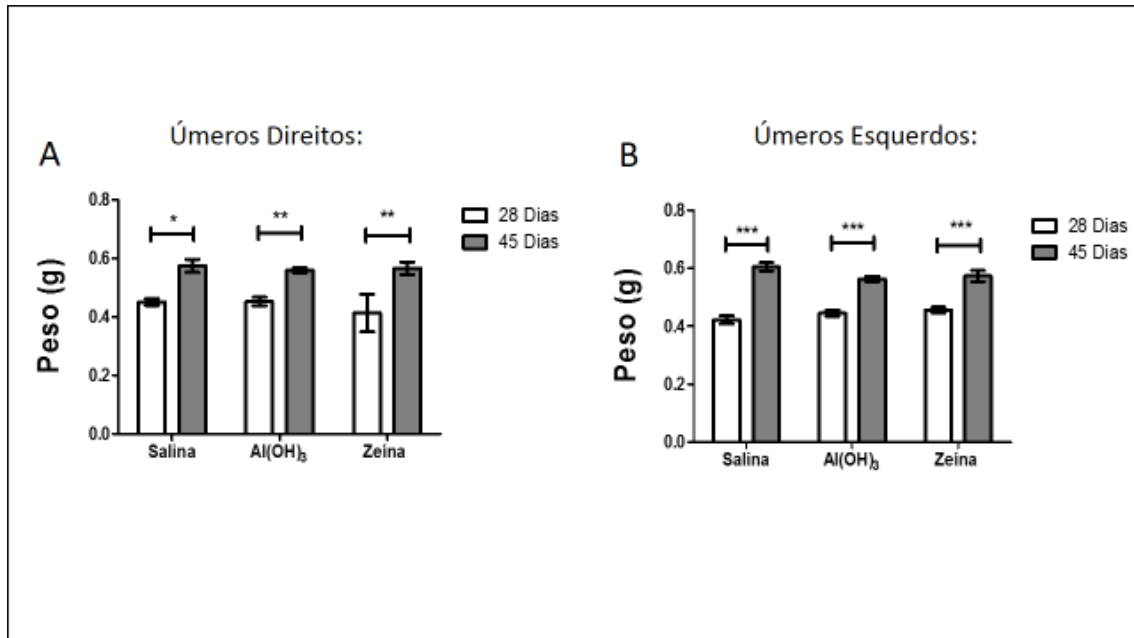


FIGURA 32: Intervenções cirúrgicas experimentais não alteraram o aumento do peso de úmeros dos animais dos grupos de 45 dias em relação aos animais do grupo de 28 dias. A) Úmeros grupo 28 dias, média geral do peso dos úmeros: 0,45g, DP± 0,02. B) Úmeros grupo 45 dias, média geral do peso dos úmeros: 0,56g, DP± 0,01g. Os dados representam a média ±SEM, sendo * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$; Para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, n= 6 para 28 dias e n= 12 para 45 dias.

6.2 - Avaliação das propriedades mecânicas ósseas:

O conteúdo mineral ósseo é um fator importante na caracterização do processo de reparo e afeta diretamente as propriedades mecânicas de um osso neoformado (BOVER *et al.*, 2017).

A partir dos resultados finais obtidos no exame de DMO pela seleção do ROI, foi identificada diferença significativa nos níveis de densidade mineral dos grupos 28 dias em relação aos grupos 45 dias nos animais salina e nos animais do grupo Al(OH)_3 ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$ respectivamente) (FIGURA 33 A). Esses achados indicam que animais de ambos os grupos não finalizaram por completo o processo de mineralização óssea em 28 dias após a realização de defeito ósseo. Surpreendentemente, os animais do grupo zeína de 28 dias encontram-se estatisticamente equiparados aos animais de 45 dias do mesmo grupo (FIGURA 33 A). Esse indicativo, alimenta forte evidência que a administração i.p. da proteína zeína, associada ao adjuvante Al(OH)_3 , pode acelerar o processo de reparo ósseo.

Para análises das tíbias esquerdas (intactas), foi selecionado o ROI no mesmo ponto de interesse equivalente as tíbias direitas (defeito). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos e períodos analisados (FIGURA 33 B).

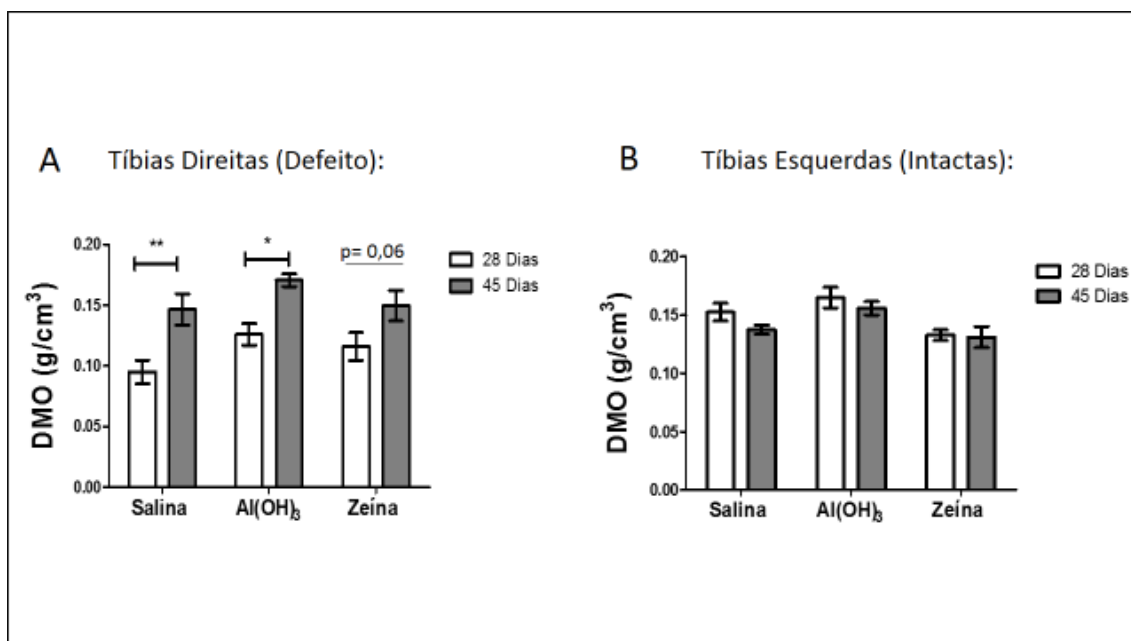


FIGURA 33: Injeção parenteral de proteína zeína adsorvida em Al(OH)₃ aumenta a densidade mineral óssea em 28 dias após defeito em relação aos grupos salina e Al(OH)₃. A) DMO tíbias 28 dias após defeito, média geral do peso das tíbias: 0.12g, DP± 0.01. B) DMO tíbias 45 dias pós lesão, média geral do peso das tíbias: 0.13g, DP± 0.02. Os dados representam a média ±SEM, sendo * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. Para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, n= 6 para 28 dias e n= 11 para 45 dias.

Quando comparado os resultados dos ensaios de flexão em três pontos do tipo cisalhamento nos períodos de 28 e 45 dias, observamos que no parâmetro força máxima (N), os animais do grupo zeína, apresentaram melhor desempenho, com diferença significativa em relação aos demais grupos ($p \leq 0,05$) (FIGURA 34 A). A força máxima traduz a quantidade máxima de carga que o corpo de prova (tecido ósseo) suporta antes de atingir a falha mecânica e romper-se (FONSECA *et al.*, 2014). Esse resultado, corrobora de forma direta com os resultados encontrados na análise de DMO, mostrando que a proteína zeína adsorvida ao adjuvante Al(OH)₃ possivelmente acelera o processo de regeneração óssea, e torna-o mais resistente a forças mecânicas externas 45 dias após o defeito ósseo instaurado.

Contudo, os parâmetros de deformação (mm) e rigidez relativa (N/mm) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (FIGURA 34 B/C), demonstrando que todos os grupos estudados em ambos períodos

experimentais absorveram de forma semelhante a tensão e o estresse proposto pelo ensaio mecânico.

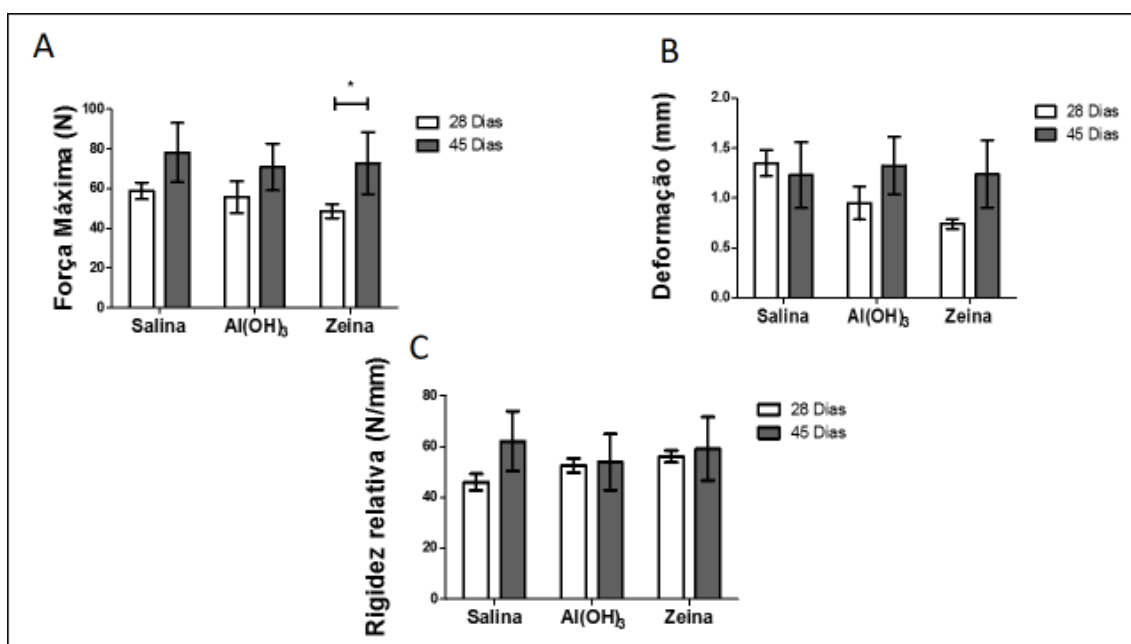


FIGURA 34: A injeção parenteral de zeína adsorvida em hidróxido de alumínio altera a propriedades mecânicas de Força Máxima (N), e não interfere em parâmetros como Deformação (mm) e Rigidez Relativa (N/mm) de tíbias em ratos Wistar machos com 28 dias quando comparados com 45 dias pós defeito ósseo. Representações gráficas dos parâmetros biomecânicos obtidos no ensaio de cisalhamento. A) Força Máxima (N) B) Deslocamento (mm) C) Rigidez Relativa (N/mm). Os dados representam a média \pm SEM, sendo * $p \leq 0,05$ para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, $n=6$ para 28 dias e $n=11$ para 45 dias.

As tíbias esquerdas (intactas) dos animais correspondentes ao grupo de 45 dias, foram encaminhadas para o ensaio de flexão em três pontos do tipo bi-apoiado, com objetivo de avaliar possíveis acentuações ou declínios da atividade celular modulada pelos efeitos sistêmicos da tolerância oral no processo natural de remodelamento ósseo.

Os resultados obtidos ao término do ensaio demonstraram que a imunização i.p de zeína acrescida do adjuvante Al(OH)₃, não alterou de forma significativa as variáveis testadas (FIGURA 35). Essa possível modulação celular, pode ocorrer de formas variáveis assim como em intensidades distintas. Para confirmarmos tal hipótese realizamos avaliação histopatológica.

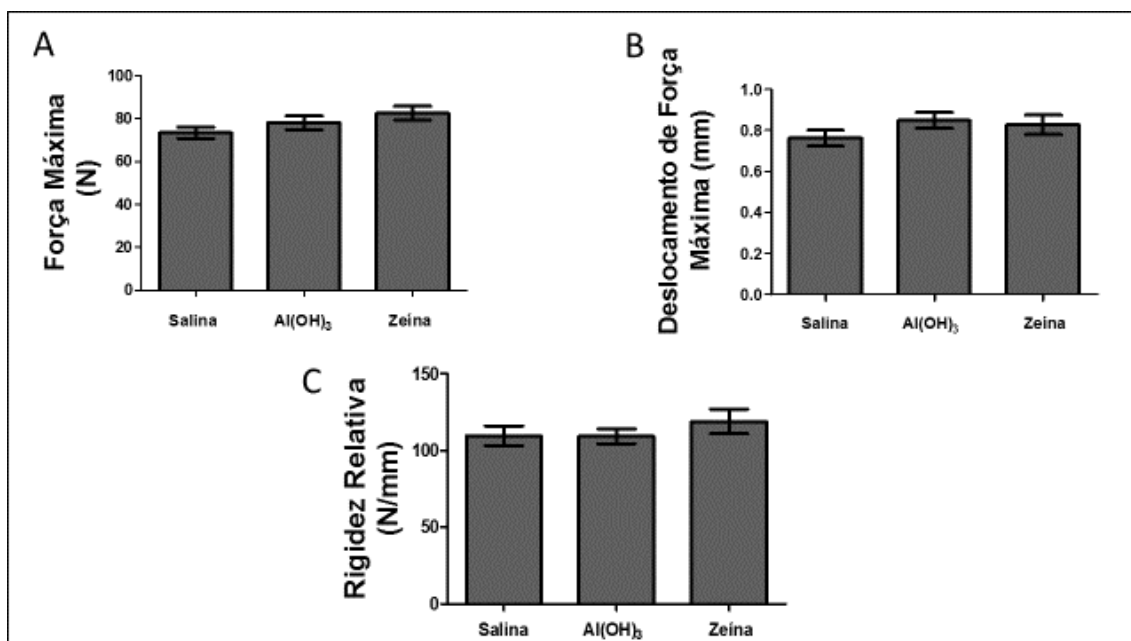


FIGURA 35: A injeção parenteral de zeína adsorvida em hidróxido de alumínio não altera as propriedades mecânicas de tíbias intactas em ratos *Wistar* machos com 45 dias após defeito ósseo. Representações gráficas dos parâmetros biomecânicos obtidos no ensaio de flexão em três pontos. A) Força máxima (N). B) Deslocamento (mm). C) Rigidez relativa (N/mm). Os dados representam a média \pm SEM, sendo $p \leq 0,05$ para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, $n = 11$.

6.3 – Avaliação Histomorfométrica do processo de reparo ósseo com 28 e 45 dias pós defeito:

De acordo com os parâmetros mecânicos encontrados nos períodos experimentais subsequentes, realizamos análises histomorfométricas em cortes transversais na região do defeito ósseo, para confrontarmos os achados morfológicos aos achados mecânicos em ambos períodos experimentais.

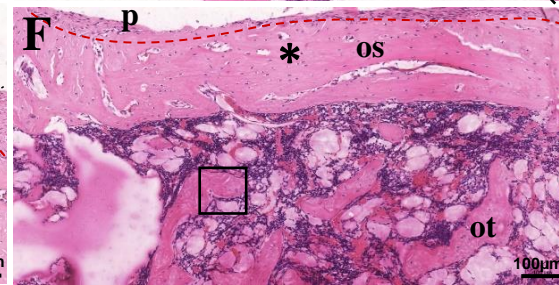
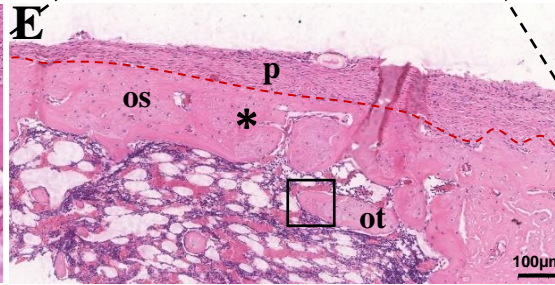
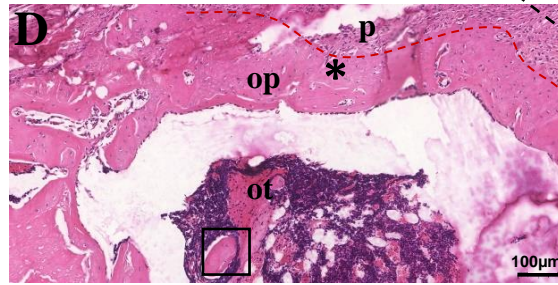
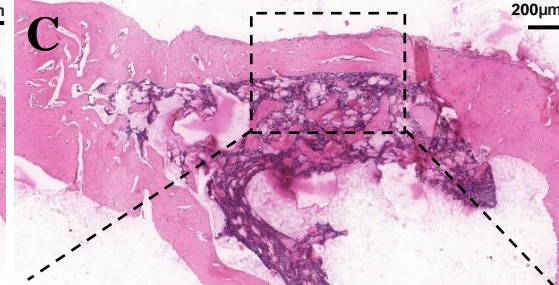
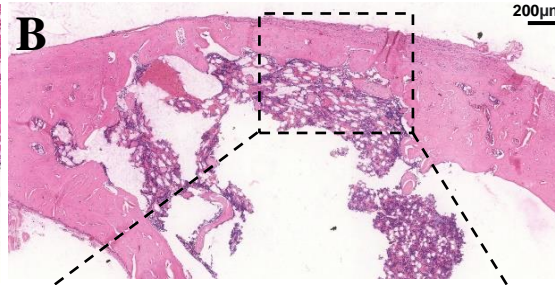
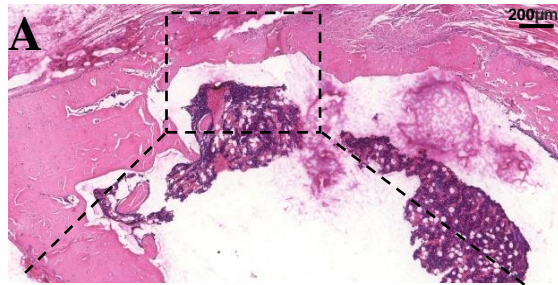
Como observado na FIGURA 36, aos 28 dias pós defeito ósseo houve semelhança entre os grupos experimentais, com uma fina camada de tecido periosteal recobrindo a área do defeito (FIGURA 36 A-F). Em maior aumento, a zona cortical nos respectivos grupos demonstra presença bem definida de osteócitos submersos na matriz orgânica mineralizada (FIGURA 36 G, H, I) fato também ocorrido na zona medular (FIGURA 36 J, K, L). Entretanto, o grupo salina exhibe características compatíveis a osso primário (OP) na formação de sua matriz,

apresentando assimetrias contínuas e falta de orientação no processo de deposição de matriz orgânica (FIGURA 36 G). Os grupos $\text{Al}(\text{OH})_3$ e zeína respectivamente, demonstram melhor configuração na deposição da matriz orgânica, além da presença de células osteoblasticas com volume e morfologia compatíveis a redução da atividade metabólica sugestiva com a formação óssea secundária (OS) (FIGURA 36 H, I, K, L).

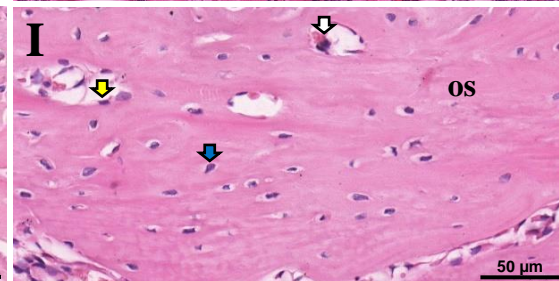
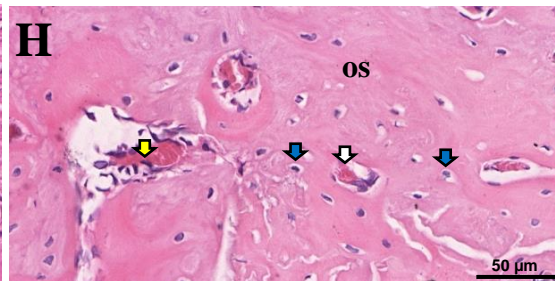
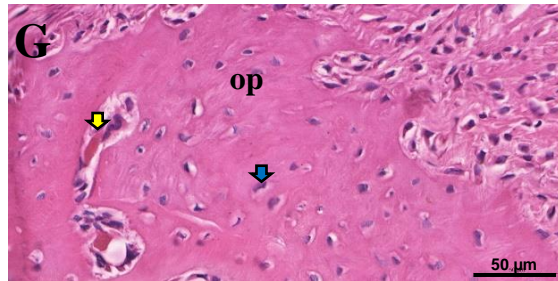
Salina

Al(OH)₃

Zeína



Cortical



Medular

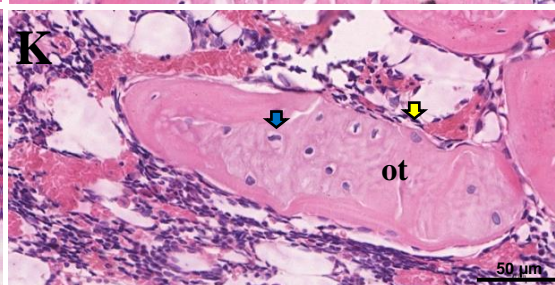
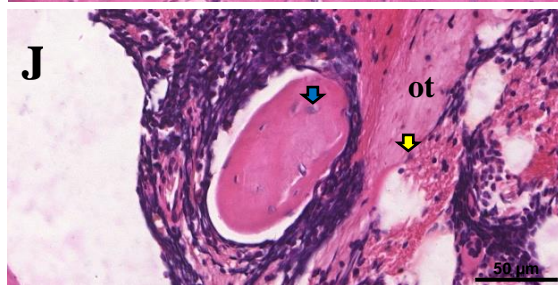


FIGURA 36: A injeção parenteral de proteína zeína absorvida em Al(OH)_3 altera os padrões morfológicos no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos *Wistar* machos 28 dias pós defeito ósseo. Imagens representativas coradas em H&E. (A, B, C) Cortes transversais da região do defeito na tíbia dos grupos estudados (barra de escala = 200 μm , n=5). (D, E, F) Ampliação da região do defeito, asterisco (*) correspondente ao osso compacto (oc) e quadrado corresponde a região de osso trabecular (ot) a região do perióstio (p) é delimitada pela linha tracejada vermelha (barra de escala = 100 μm , n=5). (G, H, I) Região óssea cortical do defeito, com a presença de osteócitos, osteoblastos (barra de escala = 50 μm , n=5). (J, K, L) Região medular com a presença osteócitos, osteoblastos (barra de escala = 50 μm , n=5). Setas azuis indicam osteócitos, setas amarelas osteoblastos.

Ao avaliarmos histomorfometricamente a área de defeito ósseo entre os grupos com 28 dias pós-defeito, encontramos maior espessura de osso neoformado no grupo zeína em relação aos demais grupos (GS $p \leq 0,001$ e GA $p \leq 0,001$) (FIGURA 37 A). Verificamos também menor área trabecular infiltrada na região da medula no grupo zeína em comparação aos demais grupos analisados (GS $p \leq 0,01$; GA $p \leq 0,01$) (FIGURA 37 B) e o número de osteócitos por campo, mostrou-se também menor no grupo zeína em relação ao grupo salina (GS $p \leq 0,01$), e equivalente entre o grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ (FIGURA 37 C).

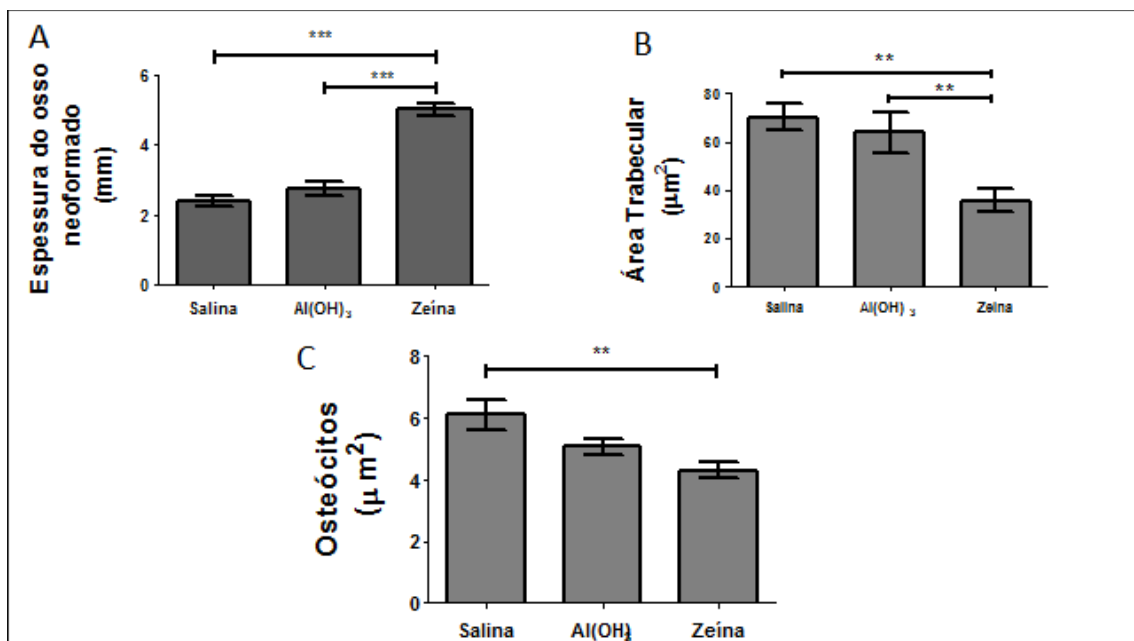


FIGURA 37: A injeção parenteral de proteína zeína absorvida em $\text{Al}(\text{OH})_3$ aumenta a espessura de osso neoformado, reduz a área trabecular e reduz o número de osteócitos por campo em tíbias de ratos *Wistar* machos 28 dias pós defeito ósseo. A) Representação gráfica da espessura de osso neoformado na região cortical do defeito B) Representação gráfica da área trabecular na região do defeito. C) Representação gráfica do osteócitos por campo na região cortical do defeito. Os dados representam a média \pm SEM, sendo ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, N= 5.

As secções relacionadas ao período de 45 dias pós defeito, se assemelham em todos os grupos estudados (FIGURA 38 A, B, C). Assim como a camada de osso compacto (oc) (FIGURA 38 D, E, F) a matriz orgânica se organiza de forma padrão para formação lamelar localizado concentricamente ao redor de sistema

Harvesiano e estruturas sugestivas a vasos sanguíneos. Nota-se ainda a distribuição homogênea de osteócitos e osteoblastos (FIGURA 38 G, H, I). A região medular segue o padrão simétrico em todos os grupos (FIGURA 38 J, K, L).

Ainda foi possível observar que as fibras colagênicas na área da lesão apresentam-se organizadas semelhantemente ao osso cortical adjacente, especialmente no grupo zeína demonstrando a constituição de um tecido ósseo mais maduro (FIGURA 39).

FIGURA 38: A injeção parenteral de proteína zeína absorvida em $Al(OH)_3$ não altera os padrões morfológicos no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos *Wistar* machos 45 dias pós defeito ósseo. Imagens representativas coradas em H&E. (A, B, C) Cortes transversais da região do defeito na tíbia dos grupos estudados (barra de escala = 200 μm , n=5). (D, E, F) Ampliação da região do defeito, asterisco (*) correspondente ao osso compacto (oc) e quadrado corresponde a região de osso trabecular (ot) (barra de escala = 100 μm , n=5). (G, H, I) Região óssea cortical do defeito, com a presença bem delimitada de osteócitos, osteoblastos com morfologia sugestiva a redução da atividade, canais de Havers e vasos sanguíneos (barra de escala = 50 μm , n=5). (J, K, L) Região medular com a presença bem delimitada de osteócitos, osteoblastos (barra de escala = 50 μm , n=5). Setas azuis indicam osteócitos, setas amarelas osteoblastos, setas vermelhas vasos sanguíneos e linha tracejada verdes canais de Havers.

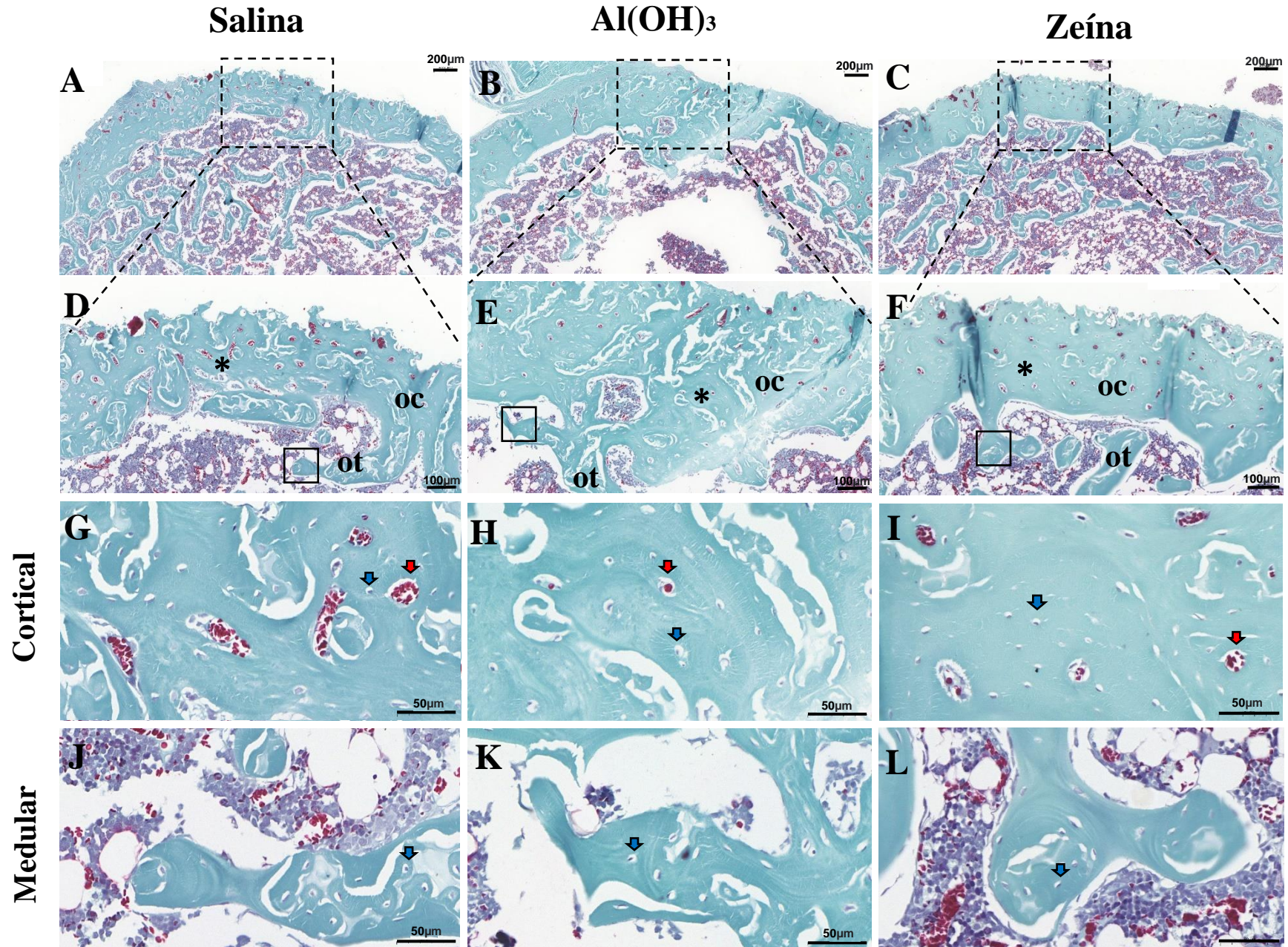


FIGURA 39: Organização semelhante das fibras colagênicas entre todos os grupos no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos *Wistar* machos 45 dias pós defeito ósseo. Imagens representativas coradas em Tricômico de Gomori. (A, B, C) Cortes transversais da região do defeito na tíbia dos grupos estudados (barra de escala = 200 μm , n=5). (D, E, F) Ampliação da região do defeito, asterisco (*) correspondente ao osso compacto (oc) e quadrado correspondente a região de osso trabecular (ot) (barra de escala = 100 μm , n=5). (G, H, I) Região óssea cortical do defeito, com a presença bem delimitada de osteócitos e vasos sanguíneos (barra de escala = 50 μm , n=5). (J, K, L) Região medular com a presença bem delimitada de osteócitos, (barra de escala = 50 μm , n=5). Setas azuis indicam osteócitos, setas vermelhas vasos sanguíneos.

Quantitativamente, não encontramos diferenças significativas nas variáveis espessura do osso secundário, área trabecular e número de osteócitos por campo em todos os grupos estudados (FIGURA 40 A, B, C).

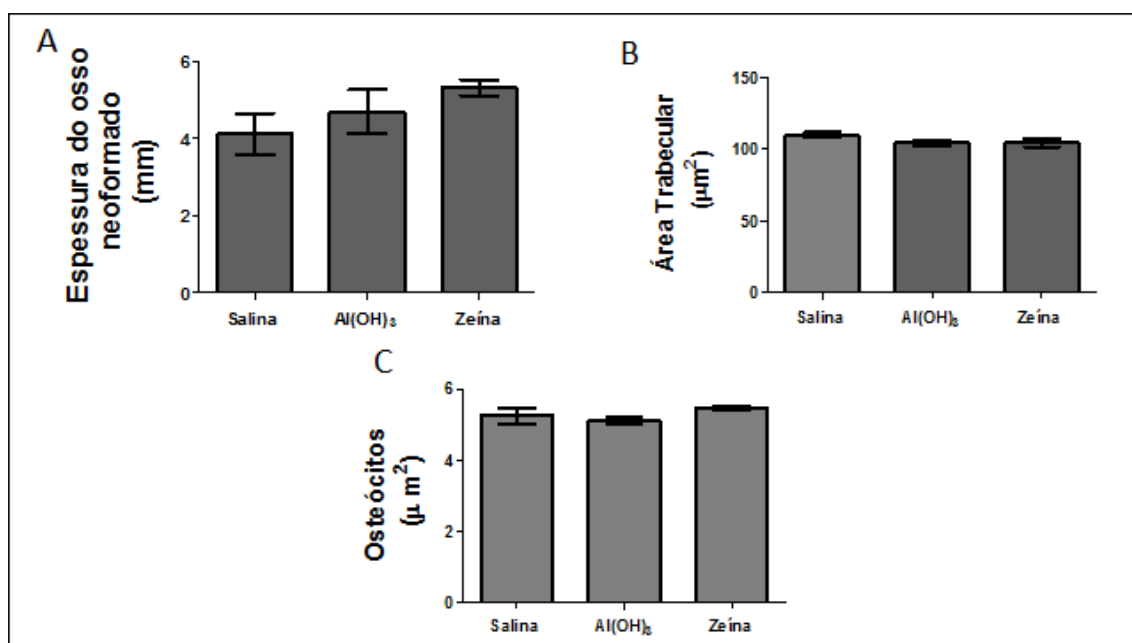


FIGURA 40: A injeção parenteral de proteína zeína absorvida em Al(OH)₃ não altera a espessura de osso secundário a área trabecular e o número de osteócitos por campo em tíbias de ratos *Wistar* machos 45 dias pós defeito ósseo. A) Representação gráfica da espessura de osso neoformado na região cortical do defeito B) Representação gráfica da área trabecular na região do defeito. C) Representação gráfica do osteócitos por campo na região cortical do defeito. Os dados representam a média \pm SEM, sendo $p \leq 0,05$ para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, $n = 5$.

Os parâmetros morfológicos analisados qualitativamente em 28 e 45 dias foram quantificados pelo score histológico (QUADRO 4) e representados graficamente (FIGURA 41), de acordo com as seguintes variáveis: Tecido ósseo neoformado, infiltrado trabecular, tecido fibrocartilaginoso e infiltrado inflamatório. Este último, não foi representado graficamente, pelo fato da análise corresponder a total ausência de células inflamatórias em todos os grupos e em ambos períodos experimentais analisados.

A variável tecido ósseo neoformado (FIGURA 41 A), mostrou-se significativamente maior no grupo zeína quando comparado ao grupo salina e grupo $Al(OH)_3$ ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$) no período de 28 dias. Trabéculas medulares e tecido fibrocartilaginoso (FIGURA 41 B-C), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos nos períodos de tempo avaliados.

Quadro 4: Resultado do score patológico para comparação do reparo das lesões ósseas entre os diferentes grupos experimentais:

Período Experimental	Grupos	Tecido ósseo Neoformado	Infiltrado Trabecular	Tecido Conjuntivo	Infiltrado Inflamatório
28 dias	Salina	++	+++	+	-
	$Al(OH)_3$	+++	+++	+	-
	Zeína	++++	++	+	-
45 dias	Salina	+++++	+++	+	-
	$Al(OH)_3$	+++++	+++	+	-
	Zeína	+++++	+++	+	-

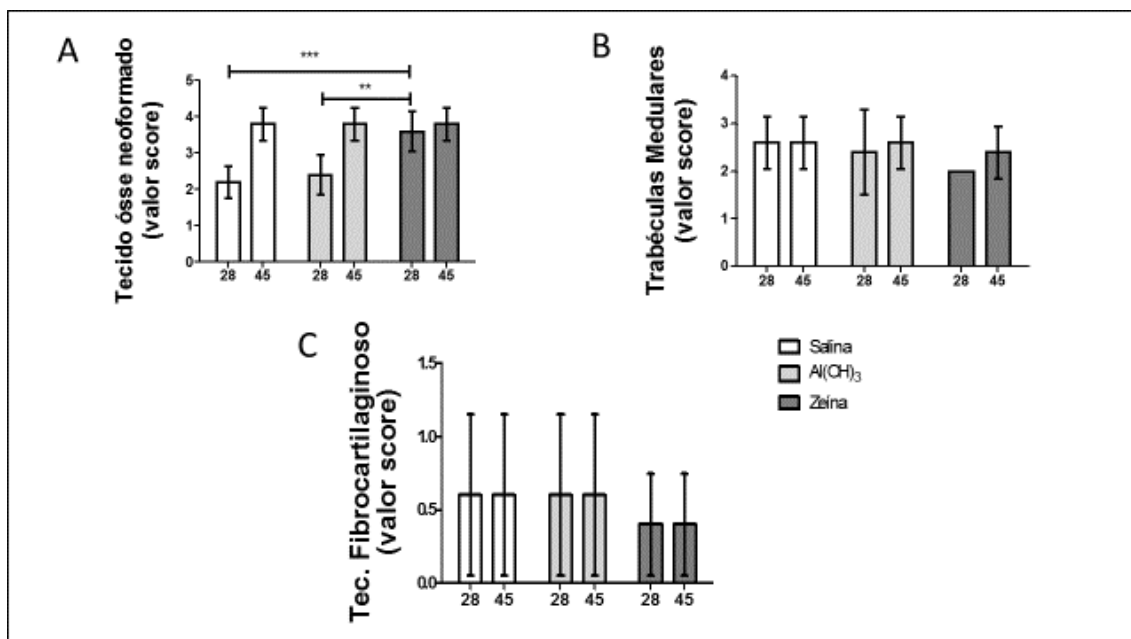


FIGURA 41: **Análises semi quantitativas representadas graficamente, correspondentes aos períodos experimentais de 28 e 45 dias pós defeito ósseo.** A) Representação gráfica semi quantitativa de tecido ósseo neoformado. B) Representação gráfica semi quantitativa de projeções trabeculares infiltradas na medula óssea. C) Representação gráfica semi quantitativa do tecido fibrocartilaginosa sobre o defeito ósseo. Os dados representam a média \pm SEM, sendo ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, N= 5.

Os achados histológicos, associados aos resultados qualitativos e semi quantitativos do referido período experimental, corroboram com os achados biomecânicos realizados nas tíbias esquerdas (intactas) em que não foram encontradas diferenças entre as variáveis analisadas. Indicando que em 45 dias pós defeito, o processo de remodelamento encontra-se equiparado e findado em todos os grupos experimentais.

7.0 – DISCUSSÃO:

De acordo com Frank Seibold (2005), o processo cinético da ingestão proteica cotidiana expõe o organismo de forma contínua e linear a uma grande variabilidade antigênica. Cabe ao sistema imunológico distinguir parâmetros nocivos e inofensivos em relação às características desses antígenos, prevenindo de maneira sistêmica o desencadeamento de respostas auto-imunes e/ou processos alérgicos (MERESSE *et al.*, 2009; PABST; MOWAT, 2012).

Ramos *et al.*, (2009), concluíram que a tolerância oral é capaz de bloquear reações mediadas por células T (DTH) e edema da pata por meio de polissacarídeos lineares carragenina, sendo um modelo amplamente utilizado para investigar a fisiopatologia inflamatória aguda. Da mesma forma, Carvalho *et al.*, (2002), observaram o bloqueio do aumento de granulomas pulmonares induzidos por injeções intravenosas de ovos de *S. mansoni* e Costa *et al.*, (2011; 2016) relatam a melhora significativa no aspecto de feridas cutâneas, reforçando ainda mais os efeitos sistêmicos ocasionados pela tolerância oral.

Até o momento não há publicações relacionando os efeitos sistêmicos da tolerância oral relacionado a eventos no tecido ósseo, sendo que nosso grupo de pesquisa é pioneiro no que se compete aos efeitos sistêmicos da tolerância no processo de reparo ósseo. O trabalho de Costa, B. H. (2021), realizado por nosso grupo de pesquisa, foi o primeiro a evidenciar efeitos da tolerância oral no tecido ósseo. Foi demonstrado que a injeção i.p da proteína zeína associada ao adjuvante Al(OH)₃ em animais tolerizados a essa proteína melhora significativamente o processo de reparo ósseo nos períodos de 7 e 14 dias pós-defeito. Em sequência, o presente trabalho reforça que os efeitos sistêmicos da tolerância oral no reparo do tecido ósseo perduram nas fases de reparo e remodelamento impactando positivamente nas qualidades morfológica e biomecânica no osso osteotomizado.

Para Ju *et al.*, (2012) e Yanagihara *et al.*, (2016), os processos traumáticos e/ou cirúrgicos em patas traseiras em modelos animais podem acarretar compensações posturais associadas a alterações de marcha com significativa diminuição da mobilidade e em consequência redução na ingestão alimentar. Submetemos nossos animais ao processo de osteotomia, com defeito ósseo de

2 mm de diâmetro no terço proximal da tíbia direita, caracterizando defeito não-crítico.

Avaliamos o ganho de peso semanal dos espécimes e relacionamos de maneira direta com a ingestão de ração para verificarmos a saúde geral animal. Nossos resultados apontaram uma curva ascendente de ganho de peso em todos os grupos experimentais, assim como a ingestão de ração ao longo de todo período experimental, demonstrando que os animais permaneceram hígidos em todos os grupos experimentais. Ademais, Curi *et al.*, (1984), afirmam que há uma tendência de estabilidade assintótica da relação ganho de peso *versus* consumo alimentar ao longo do período de vida do animal, o que podemos observar claramente nos períodos finais do nosso experimento.

Em 1987 Frost, H. M., propõe que a massa óssea pode sofrer alterações em resposta a cargas biomecânicas externas impostas sob o tecido ósseo. Procurando responder o questionamento de uma possível adaptação óssea referente ao processo cirúrgico experimental, avaliamos o peso das tíbias com defeito e intactas comparando-as em ambos os períodos experimentais. Além disso, avaliamos da mesma maneira o peso dos úmeros de forma bilateral. Em relação ao peso das tíbias submetidas ao defeito ósseo, não encontramos diferenças significativas entre os períodos analisados e as tíbias intactas e úmeros, apresentaram diferenças significativas entre ambos períodos experimentais.

Esses achados, podem ser explicados pelo fato da submissão equivalente da osteotomia nas tíbias direitas em ambos períodos experimentais, apontando para uma similaridade de organizações morfológicas de estruturas como endóstio, perióstio e formação de osso cortical. Gosain *et al.*, (2000), Pereira *et al.*, (2007) e Prado *et al.*, (2006) justificam toda essa estruturação em modelos de fraturas em ratos Wistar em um período médio de 20 a 25 dias pós defeito.

O peso das tíbias esquerdas (intactas), assim como dos úmeros, responderam de forma esperada, visto que as diferenças de parâmetros como idade cronológica e peso dos animais do grupo 45 dias (17 dias mais velhos) influenciaram de forma sistemática, o que corrobora, de forma direta, com as curvas ascendentes de ganho de peso e consumo alimentício. Ainda, por se

tratarem de variáveis hígidas apresentando características morfológicas como maior conteúdo mineral orgânico e possivelmente aumento do conteúdo medular.

Somado aos aspectos experimentais fisiológicos, as avaliações dessas variáveis tornaram-se fundamentais como forma de avaliar o impacto de estresse gerado na saúde animal, uma vez que o processo experimental como um todo poderia gerar impactos álgicos, diminuição da mobilidade associado ao estresse, levando ao déficit na ingestão de alimentar (SANTOS *et al.*, 2010).

O grande astrônomo, físico e engenheiro florentino Galileu Galilei (1564 – 1642), postulou que a base da arquitetura óssea era a soma da tensão mecânica associada principalmente pela sua funcionalidade e, somente a partir do século XIX, essa relação entre estrutura *versus* função, passou a ser amplamente conhecida pela lei de Wolff (1892), que argumenta o conceito de que há uma correlação entre os padrões de alinhamento trabecular e as direções de forças tensionais, mantendo proporcionalidade com a função (PESSAN ; VOLPON ; SHIMANO, 1996).

Para uma boa efetividade na função básica de suporte, associada à dissipação de cargas externas e reconhecimento de estímulos mecânicos, o tecido ósseo necessita de uma estruturação morfológica organizada e estruturada com sincronia entre os componentes celulares e correta formação de canicular, para dissipação energética para todo campo adjacente (MORGAN; UNNIKRISSAN; HUSSEIN, 2018; GUSMÃO; BELANGERO, 2009). Todavia, um processo de reparo ósseo, se ocorrendo de forma acelerada, pode comprometer as características biomecânicas, tornando-os mais suscetíveis a fragmentações secundárias (J.W, 1993; SARTORI *et al.*, 2008).

Segundo Miller (2017) uma forma de avaliar o grau de mineralização de um osso é utilizando o exame de DMO, sendo este um potente recurso frente ao diagnóstico de fragilidades associadas ao sistema osteomuscular. Partindo deste princípio, realizamos o exame de DMO nas tíbias (defeito e intactas) nos respectivos períodos experimentais.

Não encontramos diferenças significativas nos resultados comparativos de ambos os períodos experimentais no grupo zeína. Esse achado, reforça a

hipótese de que a administração i.p. da proteína zeína adsorvida ao $\text{Al}(\text{OH})_3$ pode acelerar o processo de reparo ósseo, aumentando a qualidade da deposição de materiais inorgânicos como por exemplo, os cristais de hidroxiapatita. Os demais grupos indicam um retardo no processo de mineralização, mostrando diferenças significativas entre os períodos experimentais.

Ainda se tratando do aumento de índices de DMO, Fonseca *et al.*, (2012) afirmam que maiores escores de DMO mantêm uma correlação direta e proporcional com a capacidade de resistência óssea. Portanto, submetemos as tíbias direitas ao teste biomecânico de cisalhamento, e, assim, como nas análises de DMO, mantivemos o comparativo entre os tempos experimentais de 28 e 45 dias.

Observamos que no parâmetro força máxima (N), o grupo zeína em 45 dias pós defeito apontou diferença significativa em relação ao seu correspondente grupo de 28 dias, apresentando maior capacidade de suporte a cargas, sugerindo que a imunização por zeína torna-o mais resistente a estresses mecânicos 45 dias pós defeito ósseo instaurado. As demais variáveis analisadas (deformação e rigidez relativa) não apresentaram diferenças significativas nos períodos estabelecidos.

Os resultados encontrados nos ensaios biomecânicos corroboram com estudos de diferentes tratamentos para regeneração óssea em modelos de fratura em ratos que associaram o aumento da DMO em conjunto com aumento dos módulos de força máxima como um indicativo de melhora da qualidade óssea (CUI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019).

Hernandez e Van Der Meulen (2017), afirmam que a qualidade da deposição mineral óssea melhora de forma subsequente e efetiva o suporte de cargas biomecânicas externas. Em um estudo recente, Mariolani *et al.*, (2021), avaliaram, por meio do ensaio mecânico de cisalhamento, tíbias de ratos machos submetidas a defeitos de 3,2 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade, em tempos distintos, incluindo o período de 28 dias, como forma de validar o modelo de teste para estudos sistêmicos e/ou locais em regeneração óssea. Concluíram, de forma sistemática, que o processo de reparo ósseo na região do defeito pôde ser quantificado por meio do teste de cisalhamento até o período de 21 dias. Após esse período, não encontraram diferenças significativas entre as variáveis

analisadas. Estes achados indicam que, após o preenchimento do defeito ósseo com áreas trabeculares, ocorre pequena ou ausência de mudanças no tecido regenerado no quesito biomecânico.

Para investigar uma possível modulação tolerogênica da proteína zeína nas tíbias esquerdas (intactas), submetemos as mesmas ao teste biomecânico de flexão em três pontos. Durante a execução dessa modalidade de ensaio, a deformação na qual a força e o deslocamento mantêm uma proporcionalidade integral, resulta em um fornecimento linear sob a curva (fase elástica). Essa deformação não é permanente, o que significa que o material retorna à sua forma original. A partir desse ponto, com a continuidade constante da força máxima sendo aplicada, ocorre a deformação permanente (fase plástica) que, por uma perspectiva morfológica, corresponde a micro rompimentos trabeculares, levando a lesões estruturais permanentes e, por consequência, à fratura óssea (SHIMANO *et al.*, 2014).

Nossos resultados não mostram diferenças entre os grupos nos parâmetros analisados. Reforça-se como investigação futura, o uso de técnicas histológicas com marcações celulares específicos para associação e melhor validação desse resultado e debates mais profundos dentro da literatura, visto que, os efeitos sistêmicos da tolerância oral no tecido ósseo ainda se encontram em fase inicial de estudos.

Einhorn, (2005) afirma que em um modelo de fratura transversal em fêmures de ratos, nos primeiros 7 a 10 dias está envolvido o processo de condrogênese, com formação de cartilagem adjacente ao local do defeito. Aos 14 dias pós defeito, há presença cartilagênica e liberação de fosfatases e proteases pelos condrócitos para formação de cartilagem calcificada. No período de 28 a 35 dias, há uma combinação de cartilagem calcificada e osso recém-formado capaz de suportar cargas mecânicas. Para tanto, Pivonka e Dunstan (2012) postulam que a qualidade do reparo ósseo está diretamente relacionada com a cinética intrínseca dos eventos fisiológicos de inflamação, formação de calosidade e remodelamento.

Para estabelecer uma conexão direta com essas afirmativas, avaliamos os aspectos morfológicos do defeito, como forma de monitorar todo processo final de reparo ósseo associado aos eventos oriundos do processo tolerogênico. Ao analisarmos cautelosamente os dados histomorfométricos, observamos que em

28 dias pós processo de defeito ósseo, houve aumento na mineralização intramedular no grupo salina e $\text{Al}(\text{OH})_3$ em relação ao zeína, possivelmente pela presença de trabéculas ósseas ainda não absorvidas de forma completa. Este resultado pode ser confirmado pela análise quantitativa na qual verificamos maior área de tecido mineralizado na região medular dos respectivos grupos em relação ao grupo zeína.

Ainda, segundo Einhorn, (2005), a reabsorção do calo ósseo mineralizado na região da medula e restabelecimento da estrutura medular original marcam o estágio final do processo de remodelamento ósseo. Reafirmando a aceleração do processo, observamos significativamente, maior espessura de osso neoformado no grupo zeína em relação aos demais grupos estudados.

Os resultados qualitativos, por sua vez, evidenciaram uma maior área de tecido neoformado, com diminutas infiltrações trabeculares, ausência de tecido fibrocartilagenoso e infiltrado inflamatório no grupo zeína, ao passo que essas variáveis encontram-se de forma simetricamente opostas nos grupos salina e $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Corroborando de forma similar com estudo de Song *et al.*, (2006), que analisou a expressão temporal de proteoglicanos durante o processo cicatricial ósseo de tíbias de ratos machos *Wistar*, e observaram a completa restauração do osso cortical no período de 28 dias pós defeito e com estudos de Vidotto *et al.*, (2017) que avaliariam de forma quantitativa e histológica o processo de regeneração óssea pós defeito também em tíbias de ratos *Wistar* submetidas a defeitos de 3,2 mm, observando padrão uniforme de osteogênese, completa absorção de tecido de granulação e diferenciação de osso cortical e canal medular remodelado. Portanto, nossos resultados efetivam a hipótese de aceleração do processo de reparo ósseo, associado à injeção i.p. da proteína zeína, absorvida em adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ pós defeito em tíbias de ratos *Wistar* no respectivo período.

Em sequência aos 45 dias pós defeito, encontramos padrões de similaridade morfológicas equivalentes entre os três grupos pré-estabelecidos, com presença de osso secundário bem formado, melhor alinhamento de fibras colagênicas e atividades equivalentes de todas as células pertencentes ao nicho celular ósseo. Esses achados, corroboram de maneira equiparada com o estudo de Oliveira *et al.*, (2021) em que foi avaliado o efeito de diferentes protocolos de irradiação de

terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) na osteointegração de implantes colocados em áreas enxertadas em ratos machos *Wistar* submetidos a osteotomia de tíbias direitas de 4 mm de comprimento e 1,5 mm de largura e seis grupos de 14 espécimes cada. Observaram, dentre outros parâmetros, que em 45 dias pós defeito instaurado, não houve diferença no aspecto morfológico caracterizado entre o grupo controle e os demais grupos analisados que por sua vez, apresentaram marcante presença de osso secundário com associação completa de canais Haversianos aos osteócitos e estrutura lamelar bem estabelecida.

Prado *et al.*, (2006) investigaram a cinética do processo de reparo em ratos machos da variedade *Wistar* submetidos ao processo de defeito ósseo na extensão látero medial do terço médio de tíbias direitas em três diferentes diâmetros (2mm, 3mm e 3,5 mm) no em distintos períodos experimentais, incluindo 45 dias. Especificamente em 45 pós defeito, observaram o fechamento de forma linear, com formação de tecido cortical espesso, intensa organização de perióstio e endóstio, além de organização lamelar estrutural.

Roslindo *et al.*, (2007) por sua vez, investigaram os efeitos da fibrina e da gelatina reabsorvível no reparo de defeito ósseo em tíbias de ratos *Wistar*, submetidos ao defeito de 5mm distal ao tubérculo medial da tíbia, a fim de verificar principalmente a eficácia desses materiais no controle de hemorragias e estímulos osteogênicos. Os espécimes foram divididos em grupo controle que foram submetidos ao mesmo processo cirúrgico e a cavidade do defeito irrigada com solução salina estéril e dois grupos experimentais submetidos aos compostos tratados. Subsequentemente, analisaram de forma histomorfométricas os períodos de 07, 14, 30 e 45 dias pós defeito. Mais uma vez, corroborando com nossos resultados, os defeitos ósseos foram completamente reparados com osso compacto, lamelar e perióstio bem desenvolvido no período de 45 dias. Esses achados reafirmam a hipótese da completa reestruturação morfológica dentro desse período experimental.

De modo geral, nossos resultados reforçam os achados de Costa *et al.*, (2011; 2016) e Cantaruti *et al.*, (2017), que conjuntamente, afirmam que os efeitos sistêmicos da tolerância oral, alteram o processo de cicatrização diminuindo a formação cicatricial em feridas incisionais e excisionais em peles de camundongos. Entretanto, ainda necessita-se de maiores estudos para elucidar

os mecanismos envolvidos no processo de reparo ósseo após a imunização com a proteína zeína absorvida ao adjuvante $Al(OH)_3$.

Dentre a infinidade de caminhos percorridos pelos efeitos sistêmicos da tolerância oral, já há indicativos que há uma maior ativação de células Tregs e, em consequência, uma maior secreção de TGF- β (REZENDE; WEINER, 2018). Li *et al.*, (2018), apontam para a atuação das células Tregs frente a inibição osteoclástica pelo eixo RANK/RANKL/OPG e o aumento da secreção de TGF β influenciando de forma fisiológica no aumento da expressão de OPG, suprimindo a ação do RANKL e de M-CSF. Essa cascata de eventos resulta na redução de osteoclastos ativos, impactando de maneira síncrona a reabsorção mineral óssea. Contudo, outras cadeias cinéticas percorridas pelos efeitos da tolerância oral provavelmente estão envolvidas no processo de reparo ósseo, reafirmando a necessidade de mais estudos a fim de embasar cientificamente toda a cinética de aceleração de reparo mediada pelos efeitos sistêmicos da tolerância oral.

8.0 - CONCLUSÕES:

Com este trabalho podemos concluir que a imunização i.p. da proteína zeína associada ao adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ em animais previamente tolerizados oralmente, melhora o processo de reparo de defeito ósseo não crítico, conferindo maior densidade mineral óssea e melhor qualidade de força máxima 28 e 45 dias pós defeito. Esses achados apontam para mais um efeito sistêmico e benéfico da tolerância oral, abrindo um leque de possibilidades para estudos que busquem futuras intervenções terapêuticas relacionadas à osteoimunologia.

9.0 - PERSPECTIVAS:

- Realizar marcações específicas para células do tecido ósseo (osteoblastos/osteoclastos) pelas técnicas de imunohistoquímica na área do defeito ósseo;
- Realizar marcações específicas para células do tecido ósseo (osteoblastos/osteoclastos) pelas técnicas de imunohistoquímica nas tíbias esquerdas (intacta);
- Realizar o exame de microtomografia (CT) nas tíbias esquerdas (defeito).

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABE, S. et al. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. **Cell Biology International**, v. 36, n. 10, p. 927–936, 2012.

AHN, A. C.; GRODZINSKY, A. J. Relevance of collagen piezoelectricity to “Wolff’s Law”: A critical review. **Medical Engineering and Physics**, v. 31, n. 7, p. 733–741, 2009.

AMBROSI, T. H.; LONGAKER, M. T.; CHAN, C. K. F. A Revised Perspective of Skeletal Stem Cell Biology. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. 43, p. 345–365, 2019.

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. 191–198, 2006.

ANDRADE, V. B. et al. Enhancement of Bone Healing by Local Administration of Carbon Nanotubes Functionalized with Sodium Hyaluronate in Rat Tibiae. **Cells Tissues Organs**, v. 204, n. 3–4, p. 137–149, 2017.

ANSARI, M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. **Progress in Biomaterials**, v. 8, n. 4, p. 223–237, dez. 2019.

BAEK, J. O.; ROH, J. Y.; JUNG, Y. Oral tolerance inhibits atopic dermatitis-like type 2 inflammation in mice by modulating immune microenvironments. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 3, p. 397–406, 2017.

BAHNEY, C. S. et al. Cellular biology of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 37, n. 1, p. 35–50, 2019.

BALCOMBE, J. P. Laboratory environments and rodents’ behavioural needs: A review. **Laboratory Animals**, v. 40, n. 3, p. 217–235, 2006.

BATISTA FILHO, M. Alimento e alimentação. **Ciência e cultura**, v. 62, n. 4, p. 20–22, 2010.

BAUD’HUIN, M. et al. Osteoprotegerin: Multiple partners for multiple functions. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 5, p. 401–409, 2013.

BEAUPIED, H.; LESPESSAILLES, E.; BENHAMOU, C. L. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 3, p. 233–239, 2007.

BERENDSEN, A. D.; OLSEN, B. R. Bone development. **Bone**, v. 80, p. 14–18, 2015.

BIAŁY, M. et al. The three-point bending test of fiber-reinforced composite root canal posts. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 29, n. 9, p. 1111–1116, 2020.

BIEWENER, A. A. Musculoskeletal design in relation to body size. **Journal of Biomechanics**, v. 24, n. 1, p. 19–29, 1991.

BIRD, E. E.; KIVELL, T. L.; SKINNER, M. M. Cortical and trabecular bone structure of the hominoid capitate. **Journal of Anatomy**, v. 239, n. 2, p. 351–373, 2021.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.

BORLACHENCO, N. G. C.; BARBOSA GONÇALVES, A. Expansão agrícola: elaboração de indicadores de sustentabilidade nas cadeias produtivas de Mato Grosso do Sul. **Interações**, v. 11, n. 6, p. 119–128, 2017.

BOVER, J. et al. Osteoporosis, bone mineral density and CKD–MBD: treatment considerations. **Journal of Nephrology**, v. 30, n. 5, p. 677–687, 2017.

BRACCO, O. L.; KAYATH, M. J.; VIEIRA, J. G. H. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 3, p. 285–291, 2003.

BRAGDON, B. C.; BAHNEY, C. S. Origin of Reparative Stem Cells in Fracture Healing. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 4, p. 490–503, 2018.

BRANDÃO, C. M. A.; VIEIRA, J. G. H. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 401–408, 1999.

BROERE, F. et al. Oral or Nasal Antigen Induces Regulatory T Cells That Suppress Arthritis and Proliferation of Arthritogenic T Cells in Joint Draining Lymph Nodes. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 899–906, 2008.

BUENO, V.; PACHECO-SILVA, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 79–85, 1999.

BURR, D. B. Why bones bend but don't break. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 11, n. 4, p. 270–285, 2011.

BURR, D. B. Changes in bone matrix properties with aging. **Bone**, v. 120, n. 9, p. 85–93, 2019.

BUTCHER, M. T. et al. In vivo strains in the femur of river cooter turtles (*Pseudemys concinna*) during terrestrial locomotion: Tests of force-platform models of loading mechanics. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 15, p. 2397–2407, 2008.

CANTARUTI, T. et al. Parenteral re-exposure to an immunologically tolerated protein up to 6h after skin injuries improves wound healing in diabetic mice. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, v. 6, n. 10, p. 100–122, 2019.

CANTARUTI, T. A. et al. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. **Immunology**, v. 151, n. 3, p. 314–323, 2017.

CARVALHO, C. R. et al. Indirect Effects of Oral Tolerance in Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 39, n. 6, p. 533–538, 1994.

CARVALHO, C. R. et al. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1195–1199, 2002.

CARVALHO, C. R.; VAZ, N. M. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 43, n. 6, p. 613–618, 1996.

CARVALHO, C. R.; VERDOLIN, B. A.; VAZ, N. M. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 3, p. 276–281, 1997.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, n. 34, p. 11–15, 2015.

CENTENO, P. P. et al. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y. P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 272–288, 2012.

CHEN, M. L. et al. Novel CD8⁺ Treg suppress EAE by TGF- β - and IFN- γ -dependent mechanisms. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 12, p. 3423–3435, 2009.

CHEN, Y. et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, v. 265, n. 5176, p. 1237–1240, 1994.

CHEN, Y. H.; WEINER, H. L. Dose-dependent activation and deletion of antigen-specific T cells following oral tolerance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 778, n. 8, p. 111–121, 1996.

CIOMS International guiding principles for biomedical research involving animals. **Alternative to laboratory animals**, v. 12, n. 4, p. 234, 1985.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 133–143, 2012a.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 145 - 149 2012b.

COLE, J. H.; VAN DER MEULEN, M. C. H. Whole bone mechanics and bone quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 8, p. 2139–2149, 2011.

COLE, J. H.; VAN DER MEULEN, M. C. H. Biomechanics of Bone. **Contemporary Endocrinology**, v. 32, n. 9, p. 185–209, 2020.

COMMINS, S. P. Mechanisms of Oral Tolerance. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 6, p. 1523–1529, 2015.

CONLON, K. C.; MILJKOVIC, M. D.; WALDMANN, T. A. Cytokines in the Treatment of Cancer. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 6–21, 2019.

CORDEY, J. Introduction: basic concepts and definitions in mechanics. **Injury**, v. 31, n. 34, p. 11–14, 2000.

COSTA, B.H. Estudo dos efeitos sistêmicos da tolerância oral no processo de reparo de defeito ósseo em ratos wistar. **Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)** - Universidade Federal de São João del Rei. Minas Gerais, p.94. 2021.

COSTA, R. A. et al. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 4, p. 487–497, 2011.

COSTA, R. A. et al. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. **Immunobiology**, v. 221, n. 3, p. 475–485, 2016.

COSTANZO, L.S. – Fisiologia – 6ª Edição, Editora Elsevier, 2018.

CUI, Y. et al. Down-regulation of LGR6 promotes bone fracture recovery using bone marrow stromal cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 99, n. 12, p. 629–637, 2018.

CUNHA, D. A. et al. Thrombospondin 1 protects pancreatic β -cells from lipotoxicity via the PERK-NRF2 pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 12, p. 1995–2006, 2016.

CURI, R. et al. Metabolic performance of free fed rats subjected to prolonged fast as compared to the metabolic pattern in rats under long term food restriction. **Physiology and Behavior**, v. 33, n. 4, p. 525–531, 1984.

CURREY, J. D. How well are bones designed to resist fracture? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 4, p. 591–598, 2003.

DA SILVA MENEZES, J. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **International Immunology**, v. 15, n. 3, p. 447–455, 2003.

DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - Fundamentos teóricos. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1675–1682, 2013.

DAVISON, K. S. et al. Bone Strength: The Whole Is Greater Than the Sum of Its Parts. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 1, p. 22–31, 2006.

DAYNA, N. et al. LASER TERAPÊUTICO NO REPARO ÓSSEO DE RATOS SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE CARGA. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 250–258, 2010.

DE MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: Mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 4, p. 317–327, 2014.

DEL C. CATELLO, J. et al. Estudo comparativo da resistência mecânica da força de compressão entre biomateriais naturais, sintéticos e mistos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 91–96, 2017.

DELGADO-CALLE, J. et al. Control of Bone Anabolism in Response to Mechanical Loading and PTH by Distinct Mechanisms Downstream of the PTH Receptor. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 3, p. 522–535, 2017.

DEVESCOVI, V. et al. Growth factors in bone repair. **La Chirurgia degli organi di movimento**, v. 92, n. 3, p. 161–168, 2008.

DOS, A. et al. O papel da Microbiota como aliada no sistema imunológico. **Arquivos do MUDI**, v. 23, n. 3, p. 345–358, 2019.

DRAKE, M. T.; KHOSLA, S. Hormonal and systemic regulation of sclerostin. **Bone**, v. 96, n. 56, p. 8–17, 2017.

DRISSI, H.; SANJAY, A. The Multifaceted Osteoclast; Far and Beyond Bone Resorption. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 1756, n. 4, p. 1753–1756, 2016.

DUNKIN, D.; BERIN, M. C.; MAYER, L. Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvant-dependent manner. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1251–1258.e2, 2011.

DWEK, J. R. The periosteum: What is it, where is it, and what mimics it in its absence? **Skeletal Radiology**, v. 39, n. 4, p. 319–323, 2010.

EINHORN, T. A. Bone strength: The bottom line. **Calcified Tissue International**, v. 51, n. 5, p. 333–339, 1992.

EINHORN, T. A. The science of fracture healing. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 19, n. 10, p. 19–21, 2005.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: Mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology** v.20, n.34. p. 356-378, 2015.

ESTERHÁZY, D. et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 126–130, 2019.

FAGEER, A. S. M.; EL TINAY, A. H. Effect of genotype, malt pretreatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 613–619, 2004.

FALCAI, M. J. et al. Swimming activity prevents the unloading induced loss of bone mass, architecture, and strength in rats. **BioMed Research International**, v. 65, n. 7, p. 123–128, 2015.

FARIA, A. M. C. et al. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 102, n. 1, p. 67–80, 1998.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: Mechanisms and therapeutic applications. **Advances in Immunology**, v. 73, n. 73, p. 153–264, 1999.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 232–259, 2005.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 13, n. 2–4, p. 143–157, 2006.

FENG, X. H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through smads. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 659–693, 2005.

FLORÊNCIO-SILVA, RINALDO, G R S SASSO, ESTELA SASSO-CERRI, M. DE J. S. P. S. C. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 7, n. 6, p. 17–24, 2015.

FONSECA, H. et al. Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. **Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 37–53, 2014.

FONSECA, R. M. C. et al. Bone mineral density associated with physical traits and lifestyle in adolescents. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 6, p. 381–384, 2012.

FRANCO-VALENCIA, K. et al. Subcutaneous injection of an immunologically tolerated protein up to 5 days before skin injuries improves wound healing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, n. 8, p. 1–10, 2022.

FRANKEL, V. H.; KAPLAN, D. J.; EGOL, K. A. Biomechanics of fractures. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 30, n. 8, p. 52–56, 2016.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 1, p. 176–190, 2006.

FRASSICA, F. J. et al. Skeletal system: Biomechanical concepts and relationships to normal and abnormal conditions. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 27, n. 4, p. 321–327, 1997.

FRIEDMAN, A.; WEINER, H. L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 14, p. 6688–6692, 1994.

FROST, H. M. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. **The Anatomical Record**, v. 219, n. 1, p. 1–9, 1987.

FROST, H. M. Bone’s Mechanostat: A 2003 Update. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 275, n. 2, p. 1081–1101, 2003.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the Piezoelectric Effect of Bone. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 12, n. 10, p. 1158–1162, 1957.

GAFFNEY-STOMBERG, E. The Impact of Trace Minerals on Bone Metabolism. **Biological Trace Element Research**, v. 188, n. 1, p. 26–34, 2019.

GARNER, J. P. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: Potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. **ILAR Journal**, v. 46, n. 2, p. 106–117, 2005.

GERSTENFELD, L. C. et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 5, p. 873–884, 2003.

GHIASI, M. S. et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. **Bone Reports**, v. 6, n. 78, p. 87–100, 2017.

GIBON, E. et al. Inflammation, ageing, and bone regeneration. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 10, n. 6, p. 28–35, 2017.

GOERKE, S. M. et al. Endothelial progenitor cells from peripheral blood support bone regeneration by provoking an angiogenic response. **Microvascular Research**, v. 98, p. 40–47, 2015.

GOODMAN, S. B. et al. Inflammation and bone repair: From particle disease to tissue regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2019.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in cranial defects: Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 106, n. 2, p. 360–371, 2000.

GUSMÃO, C.; BELANGERO, D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 19, p. 7, 2009.

GUYTON, A.C. e Hall J.E.– Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, n. 9, p. 385–396, 2006.

HARRISON, O. J.; POWRIE, F. M. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, p. 1–17, 2013.

HART, N. H. et al. Mechanical basis of bone strength: Influence of bone material, bone structure and muscle action. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 17, n. 3, p. 114–139, 2017.

- HAUGH, M. G.; VAUGHAN, T. J.; MCNAMARA, L. M. The role of integrin $\alpha V\beta 3$ in osteocyte mechanotransduction. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 42, p. 67–75, 2015.
- HEMMATIAN, H. et al. Aging , Osteocytes , and Mechanotransduction. **Curr Osteoporos**, v. 34, n. 54, p. 401–411, 2017.
- HERNANDEZ, C. J.; VAN DER MEULEN, M. C. H. Understanding Bone Strength Is Not Enough. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 6, p. 1157–1162, 2017.
- HIENZ, S. A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 34, n. 54, p. 234–256, 2015.
- HOLANDA, A. J.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Efeitos da orientacao das fibras de colageno nas propriedades mecanicas de flexao e impacto dos ossos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, n. 11–12, p. 579–584, 1999.
- HOSTMANN, A. et al. Preexisting antigen-specific immune responses are modulated by oral KLH feeding in humans. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1991–1996, 2015.
- HOYER, H. E.; LIPPERT, H. Biomechanical changes in long limb bones of HAN-Wistar rats during postnatal development. **Anatomy and Embryology**, v. 164, n. 1, p. 101–111, 1982.
- HU, C. et al. Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 219, n. 7, p. 1234–1345, 2019.
- HU, K.; OLSEN, B. R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 2, p. 509–526, 2016.
- HUANG, X. et al. The roles of osteocytes in alveolar bone destruction in periodontitis. **Journal of Translational Medicine**, v. 34, n. 4, p. 1–15, 2020.
- IKEBUCHI, Y. et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. **Nature**, v. 561, n. 7722, p. 195–200, 13 set. 2018.
- INFANTE, M. et al. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: Involvement in breast cancer and clinical perspectives. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1–18, 2019.
- ISE, W. et al. Orally Tolerized T Cells Can Form Conjugates with APCs but Are Defective in Immunological Synapse Formation. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 829–838, 2005.

J.W, M. Fracture Mechanics of Bone. **Journal of biomechanical engineering**, v. 115, n. 11, p. 549–555, 1993.

JABRI, B.; ABADIE, V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 771–783, 2015.

JAENSSON, E. et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 9, p. 2139–2149, 2008.

JANG, M. H. et al. Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 6110–6115, 2004.

JU, Y. I. et al. Differential effects of jump versus running exercise on trabecular architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 766–772, 2012.

JURA-PÓŁTORAK, A. et al. Bone metabolism and RANKL/OPG ratio in rheumatoid arthritis women treated with TNF- α inhibitors. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 13, 2021.

KELLER, A. C. et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 283–290, 2006.

KHOSLA, S. et al. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 4, p. 1550–1554, 2002.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. Regulation of bone metabolism by sex steroids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576–581, 2012.

KIM, J. M. et al. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 23, p. 207-214, 2020.

KLEIN-NULEND, J. et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 5, p. 855–865, 2015.

KLEIN-NULEND, J.; BACABAC, R. G.; BAKKER, A. D. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. **European Cells and Materials**, v. 24, p. 278–291, 2012.

KNOOP, K. A.; MILLER, M. J.; NEWBERRY, R. D. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: Different paths, different outcomes. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 2, p. 112–118, 2013.

KOBAYASHI, N. et al. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2019.

KODAMA, J. Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 43, n. 56, p. 1234–1345, 2020.

KOMORI, T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 313–323, 2018.

KOMORI, T. Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 1–15, 2020.

KOVÁCS, B.; VAJDA, E.; NAGY, E. E. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

LAD, S. E.; MCGRAW, W. S.; DA EGLING, D. J. Haversian remodeling corresponds to load frequency but not strain magnitude in the macaque (*Macaca fascicularis*) skeleton. **Bone**, v. 127, n. 4, p. 571–576, 2019.

LEE, G. L. et al. TLR2 promotes vascular smooth muscle cell chondrogenic differentiation and consequent calcification via the concerted actions of osteoprotegerin suppression and IL-6-Mediated RANKL induction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 3, p. 432–445, 2019.

LEE, K. S.; HONG, S. H.; BAE, S. C. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein. **Oncogene**, v. 21, n. 47, p. 7156–7163, 2002.

LEE, W. et al. Energy Metabolism of the Osteoblast: Implications for Osteoporosis. **Endocrine Society**, v. 11, n. 87, p. 255–266, 2017.

LEFÈVRE, E. et al. Compositional and mechanical properties of growing cortical bone tissue: a study of the human fibula. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

LEKO, M. B. et al. Environmental factors that affect parathyroid hormone and calcitonin levels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, 2022.

- LEPPIK, L. et al. Combining electrical stimulation and tissue engineering to treat large bone defects in a rat model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- LI, J. et al. Regulatory T-cells: Potential regulator of tissue repair and regeneration. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2018.
- LI, L. et al. Functionalized cell-free scaffolds for bone defect repair inspired by self-healing of bone fractures: A review and new perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, n. 12, p. 1241–1251, 2019.
- LI, M. et al. Characterization of the protein and peptide of excipient zein by the multi-enzyme digestion coupled with nano-LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 321, n. March, p. 126–172, 2020.
- LIEDERT, A. et al. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 1, p. 1–5, 2006.
- LILL, C. A. et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 5, p. 836–842, 2003.
- LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 207–221, 2007.
- LIN, Z. et al. Periosteum: Biology and applications in craniofacial bone regeneration. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 2, p. 109–116, 2014.
- LIND, M.; BÜNGER, C. Factors stimulating bone formation. **European Spine Journal**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 102–110, 2001.
- LINDBERG, G. et al. A two-dimensional model for stress driven diffusion in bone tissue. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 18, n. 5, p. 457–467, 2015.
- LIU, H. et al. MiR-148a regulates bone marrow mesenchymal stem cells-mediated fracture healing by targeting insulin-like growth factor 1. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 1350–1361, 2019.
- LIU, S. et al. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 1, 2006.
- LOI, F. et al. Inflammation, Fracture and Bone Repair. **Bone**, v. 86, p. 119–130, 2016.

LONGONI, A. et al. The impact of immune response on endochondral bone regeneration. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2018.

LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, n. 4, p. 240–275, 2018.

MABBOTT, N. A. et al. Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 4, p. 666–677, 2013.

MACIEL, R. A. CONTRERAS, Jesús; GRACIA, Mabel. Alimentação, sociedade e cultura. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011. 496 p. **Horizontes Antropológicos**, v. 18, p. 403–406, 2012.

MACPHERSON, A. J. et al. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 11–22, 2008.

MAGGIANO, I. S. et al. Three-dimensional reconstruction of Haversian systems in human cortical bone using synchrotron radiation-based micro-CT: Morphology and quantification of branching and transverse connections across age. **Journal of Anatomy**, v. 228, n. 5, p. 719–732, 2016.

MARAHLEH, A. et al. TNF- α Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 12, p. 3456–3654, 2019.

MARGARETA, V. H. N.; FRANKEL. **Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético**. 4 Edição ed. Rio de Janeiro 2014.

MARIOLANI, J. R. L. et al. Punch shear test for quantitative evaluation of bone defect repair in Wistar rat tibia. **Injury**, v. 52, n. 6, p. 13–17, 2021.

MARTIN, A.; DAVID, V.; DARRYL QUARLES, L. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 131–155, 2012.

MARTINELLI, S. S.; CAVALLI, S. B. Healthy and sustainable diet: A narrative review of the challenges and perspectives. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 11, p. 4251–4262, 2019.

MARUYAMA, M. et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2020.

MATTARAIA, V. G. DE M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1490–1496, 2012.

MAYER, L.; SHAO, L. Therapeutic potential of oral tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 407–419, 2004.

MCDOLE, J. R. et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103 + dendritic cells in the small intestine. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 345–349, 2012.

MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W.; MARRACK, P. How Do Adjuvants Work? Important Considerations for New Generation Adjuvants. **Immunity**, v. 27, n. 5, p. 687–690, 2007.

MERESSE, B. et al. Celiac disease: From oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 1, p. 8–23, 2009.

MILANOVA, V.; IVANOVSKA, N.; DIMITROVA, P. and OPG Production in Neutrophils from Arthritic Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

MILLER, A. et al. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 1, p. 421–425, 1992.

MILLER, P. D. The history of bone densitometry. **Bone**, v. 104, p. 4–6, 2017.

MIRANDA, G. S. et al. Biodiversidade e interação de ectoparasitos em roedores silvestres *Holochilus sciureus* Wagner, 1842 (Rodentia: Cricetidae), capturados no estado do Maranhão, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 1, p. 97–102, 2017.

MIRENDA, V. et al. Tolerant T cells display impaired trafficking ability. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 7, p. 2146–2156, 2005.

MORGAN, E. F.; UNNIKRISSAN, G. U.; HUSSEIN, A. I. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 20, p. 119–143, 2018.

MOUNTZIARIS, P. M.; MIKOS, A. G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 14, n. 2, p. 179–186, 2008.

MOWAT, A. M. et al. Immunological responses to fed protein antigens in mice. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. **Immunology**, v. 45, n. 1, p. 105–113, 1982.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 2014.

MOWAT, A. M. I. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331–341, 2003.

MU-FORSTER, C. et al. Surface Localization of Zein Storage Proteins in Starch Granules from Maize Endosperm 1 Proteolytic Removal by Thermolysin and in Vitro Cross-Linking of Granule-Associated Polypeptides Starch granules from maize (*Zea mays*) contain a characteristic group o. p. 1563–1571, 1998.

MU-FORSTER, C.; WASSERMAN, B. P. Surface Localization of Zein Storage Proteins in Starch Granules from Maize Endosperm. **Plant physiology**, v. 116, n. 4, p. 1563–1571, 1998.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256–260, 2007.

MURPHY, M. P. et al. The Role of Skeletal Stem Cells in the Reconstruction of Bone Defects. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 28, n. 5, p. 1136–1141, 2017.

MURSHED, M. Mechanism of bone mineralization. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2018.

NAGY, V.; PENNINGER, J. M. The RANKL-RANK Story. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 534–542, 2015.

NAKASHIMA, T. et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1231–1234, 2011.

NAM, D. et al. T-lymphocytes enable osteoblast maturation via IL-17F during the early phase of fracture repair. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 40–44, 2012.

NAOT, D.; MUSSON, D. S.; CORNISH, J. The activity of peptides of the calcitonin family in bone. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 781–805, 2019.

NESI, G. A.; FRANCO, M. R.; CAPEL, L. M. M. a Disbiose Da Microbiota Intestinal, Sua Associação No Desenvolvimento De Doenças Neurodegenerativas E Seus Possíveis Tratamentos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 636–645, 2020.

NOTOYA, M. et al. Runx-2 is not essential for the vitamin D-regulated expression of RANKL and osteoprotegerin in osteoblastic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 655–660, 2004.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 137, n. 1, p. 1–15, 2015.

OLIVEIRA, O. R. G. DE et al. O uso de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e pseudoartroses, uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 52, n. 2, p. 124–140, 2017.

OLIVEIRA, G. J. P. L. et al. Effect of different low-level intensity laser therapy (LLLT) irradiation protocols on the osseointegration of implants placed in grafted areas. **Journal of Applied Oral Science**, v. 29, p. 1–12, 2021.

OLSSON, I. A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: A review of “environmental enrichment”. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 3, p. 243–270, 2002.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325–341, 2018.

ONO, T.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 4, p. 367–375, 2017.

OREFFO, R. O. C. et al. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, n. 3, p. 817–823, 1989.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 3, p. 232–239, 2012.

PAIATTO, L. N. et al. Oral tolerance induced by OVA intake ameliorates TNBS-induced colitis in Mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.

PAJARINEN, J. et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. **Biomaterials**, v. 196, p. 80–89, 2019.

PANAHIPOUR, L. et al. Tgf- β activity of a demineralized bone matrix. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–12, 2021.

PAPACHRONI, K. K. et al. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 208–216, 2009.

PAPALIA, I. L. P. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 552–559, 2015.

PEARSON, O. M.; LIEBERMAN, D. E. The aging of Wolff's “law”: Ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 47, p. 63–99, 2004.

PEREIRA, A. C. et al. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 1, p. 93–97, 2007.

PESSAN, V. J. O.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Ensaio mecânico de flexão nas faces côncavas e convexas da diáfise do fêmur de ratas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 31, n. 7, p. 600–604, 1996.

PIVONKA, P. et al. Theoretical investigation of the role of the RANK-RANKL-OPG system in bone remodeling. **Journal of Theoretical Biology**, v. 262, n. 2, p. 306–316, 2010.

PIVONKA, P.; DUNSTAN, C. R. Role of mathematical modeling in bone fracture healing. **Bone KEy Reports**, v. 1, 14 nov. 2012.

POLITI, F. A. S.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 17–28, 2008.

PRADO, F. DE A. et al. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 7–13, 2006.

RADASCH, R. M. Biomechanics of bone and fractures. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 29, n. 5, p. 1045–1082, 1999.

RAMOS, G. C. et al. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. **Immunology**, v. 126, n. 3, p. 354–362, 2009.

RASMUSSEN, E. B.; NEWLAND, M. C.; HEMMELMAN, E. The Relevance of Operant Behavior in Conceptualizing the Psychological Well-Being of Captive Animals. **Perspectives on Behavior Science**, v. 43, n. 3, p. 617–654, 2020.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 30, n. 7, p. 3–11, 2017.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. Cellular components and mechanisms of oral tolerance induction. **Critical Reviews in Immunology**, v. 38, n. 3, p. 207–231, 2018.

RIMANIOL, A. C. et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. **Vaccine**, v. 22, n. 23–24, p. 3127–3135, 2004.

RIOS, F. J.; TOUYZ, R. M.; MONTEZANO, A. C. Isolation and differentiation of murine macrophages. **Methods in Molecular Biology**, v. 1527, p. 297–309, 2017.

ROCHA, V. M.; GASPAR, H. A.; OLIVEIRA, C. F. DE. Fracture risk assessment in home care patients using the FRAX® tool. **Einstein**, v. 16, n. 3, p. 11–32, 2018.

ROCHETTE, L. et al. The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.

RODRIGUES, C. M. et al. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: Mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 517–525, 2006.

RODRIGUEZ-CASTRO, K. I. et al. Autoimmune diseases in autoimmune atrophic gastritis. **Acta Biomedica**, v. 89, p. 100–103, 2018.

ROE, S. Biomechanics of Fracture Fixation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 50, n. 1, p. 1–15, 2020.

ROSA, N. et al. From mechanical stimulus to bone formation: A review. **Medical Engineering and Physics**, v. 37, n. 8, p. 719–728, 2015.

ROSLINDO, E. B.; VIOLA, N. V.; GASPAR, A. M. M. Effects of fibrin sealer and resorbable gelatin on the repair of osseous defects in rat tibia. **Brazilian Oral Research**, v. 21, n. 3, p. 222–227, 2007.

ROSSET, E. M.; BRADSHAW, A. D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. **Matrix Biology**, v. 52–54, p. 78–87, 2016.

RUBIN, C. et al. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 83, n. 2, p. 259–270, 2001.

RUFF, W. E.; GREILING, T. M.; KRIEGEL, M. A. Host–microbiota interactions in immune-mediated diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 521–538, 2020.

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, n. 54, p. 95–106, 2016a.

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 95–106, 2016b.

SALHOTRA, A. et al. Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v.11, p. 54-68, 2020.

SAMPSON, H. A. et al. Mechanisms of food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 11–19, 2018.

SANTOS, M. L. DOS; BORGES, G. F. Exercício físico no tratamento e prevenção de idosos com osteoporose: uma revisão sistemática. **Fisioterapia em Movimento**, v. 23, n. 2, p. 289–299, 2010.

SANTOS, M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, p. 106101, 2010.

SARTORI, A. R. et al. Bone repair process in normal and osteopenic female rats' tibiae: A comparative study. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 37–40, 2008.

SATITSUKSANOVA, P. et al. Regulatory immune mechanisms in tolerance to food allergy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1–9, 2018.

SCHAALAN, M.; MOHAMED, W. Predictive ability of circulating osteoprotegerin as a novel biomarker for early detection of acute kidney injury induced by sepsis. **European Cytokine Network**, v. 28, n. 2, p. 52–62, 2017.

SCHMIDT-BLEEK, K. et al. BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 27, p. 141–148, 2016.

SCHMITT, B. et al. Ensaio biomecânico para determinação do diâmetro de barra conectora de polimetilmetacrilato em fixador esquelético externo tipo la no úmero de suínos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 779–786, 2018.

SCOTT, A. et al. Mechanotransduction in human bone: In vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. **Sports Medicine**, v. 38, n. 2, p. 139–160, 2008.

SEIBOLD, F. Food-induced immune responses as origin of bowel disease? **Digestion**, v. 71, n. 4, p. 251–260, 2005.

SENEFONTE, F. R. DE A. et al. Primary amputation after trauma: profile of a hospital in the Mid-West of Brazil. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 11, n. 4, p. 269–276, 2012.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European Cells and Materials**, v. 15, n. 56, p. 53–76, 2008.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636–645, 2009.

SHIMADA, T. et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 561–568, 2004a.

SHIMADA, T. et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 429–435, 2004b.

SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B. Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 4, p. 330–338, 2009.

SHIMANO, R. C. et al. Biomechanical and microstructural benefits of physical exercise associated with risedronate in bones of ovariectomized rats. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 6, p. 431–438, 2014.

SHIRAKAWA, J. et al. Flrt2 is involved in fine-tuning of osteoclast multinucleation. **BMB Rep**, v. 52, n. 8, p. 514–519, 2019.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: The industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171–192, 2001.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–245, 2016.

SITARA, D. et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. **Matrix Biology**, v. 23, n. 7, p. 421–432, 2004.

SOKOLOVSKA, A.; HEM, S. L.; HOGENESCH, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**, v. 25, n. 23, p. 4575–4585, 2007.

SONG, S. J. et al. Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing. **Gene**, v. 379, n. 1–2, p. 92–100, 2006.

SOUZA LIMA, R.; FERREIRA NETO, J. A.; PEREIRA FARIAS, RITA DE CÁSSIA, M. C. Alimentação, Comida E Cultura: O Exercício Da Comensalidade. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição ; Saúde**, v. 10, n. 3, p. 507–522, 2015.

SPAHN, T. W. et al. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 4, p. 1278–1287, 2001.

SRINIVASAN, A.; WONG, F. K.; KARPONIS, D. Calcitonin: A useful old friend. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 20, n. 4, p. 600–609, 2020.

STILLS, H. F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 280–293, 2005.

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. I. Immune responses to dietary antigens: Oral tolerance. **Immunology Today**, v. 19, n. 4, p. 173–181, 1998.

SUN, G. et al. Regulatory B cell is critical in bone union process through suppressing proinflammatory cytokines and stimulating Foxp3 in Treg cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 4, p. 455–462, 2017.

SUTTI, S. et al. CX3CR1-expressing inflammatory dendritic cells contribute to the progression of steatohepatitis. **Clinical Science**, v. 129, n. 9, p. 797–808, 2015.

SZABÓ, M. E. et al. Similar damage initiation but different failure behavior in trabecular and cortical bone tissue. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 8, p. 1787–1796, 2011.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 4, p. 287–293, 2005.

TAKENAKA, M. C.; QUINTANA, F. J. Tolerogenic dendritic cells. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 2, p. 113–120, 2017.

TANAKA, S. et al. RANKL: A therapeutic target for bone destruction in rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**, v. 28, n. 1, p. 9–16, 2018.

TANI, S. et al. Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1166–1177, 2020.

TEMIYASATHIT, S.; JACOBS, C. R. Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 422–428, 2010.

THOMAS, H. C.; PARROTT, D. M. V. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. **Immunology**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 1974.

TONG, X. et al. Beclin 1 positively regulates osteoprotegerin-induced inhibition of osteoclastogenesis by increasing autophagy in vitro. **Differentiation**, v. 121, n. 8, p. 35–43, 2021.

TORDESILLAS, L.; BERIN, M. C. Mechanisms of Oral Tolerance. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 55, n. 2, p. 107–117, 2018.

TRESGUERRES, F. G. F. et al. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. **Annals of Anatomy**, v. 227, n. 8, p. 151422, 2020.

TSUJI, N. M.; MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. I. Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. **Immunology**, v. 103, n. 4, p. 458–464, 2001.

TSUKASAKI, M.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: evolving concepts in bone–immune interactions in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 10, p. 626–642, 2019.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799–809, 2009.

TURUNEN, M. J. et al. Sub-trabecular strain evolution in human trabecular bone. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

UNTERSMEYR, E. et al. Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 6, p. 1–16, 2005.

VAN DAM, P. A. et al. RANK/RANKL signaling inhibition may improve the effectiveness of checkpoint blockade in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 133, n. 8, p. 85–91, 2019.

VAN DEN BERG, H. et al. Different mechanisms regulate CD4+ T cell independent induction of oral and nasal tolerance of CD8+ T cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 2, p. 163–171, 2010.

VAN TOL, A. F. et al. The mechanoreponse of bone is closely related to the osteocyte lacunocanalicular network architecture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 51, p. 32251–32259, 2020.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, n. 2, p. 110–115, 1977.

VIDOTTO, V. T. et al. Quantitative Evaluation of Experimental Bone Regeneration Using Indentation Tests. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 71–76, 2017.

VILAYPHIOU, N. et al. Finite element analysis performed on radius and tibia HR-pQCT images and fragility fractures at all sites in postmenopausal women. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1030–1037, 2010.

WAKABAYASHI, A. et al. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. **Immunology**, v. 119, n. 2, p. 167–177, 2006.

WAMBRE, E.; JEONG, D. Oral Tolerance Development and Maintenance. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 27–37, 2018.

WANG, H.; BAI, X. Mechanisms of Bone Remodeling Disorder in Hemophilia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 47, n. 1, p. 43–52, 2021.

WARZECHA, M. et al. Trabecular bone score (Tbs) in clinical practice – Rewiev. **Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja**, v. 20, n. 5, p. 347–359, 2018.

WEATHERHOLT, A. M.; FUCHS, R. K.; WARDEN, S. J. Specialized connective tissue: Bone, the structural framework of the upper extremity. **Journal of Hand Therapy**, v. 25, n. 2, p. 123–132, 2012.

WEBSTER, J. D. et al. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 57, n. 8, p. 753–761, 2009.

WELLS, H. G. Studies on the chemistry of anaphylaxis. Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. **Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 147–171, 1911.

WELLS, H. G.; OSBORNE, T. B. The biological reactions of the vegetable proteins i. anaphylaxis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1,3, p. 66–124, 1911.

WHITE, K. E. et al. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. **Nature Genetics**, v. 26, n. 3, p. 345–348, 2000.

WHITESIDE, T. L. Disarming suppressor cells to improve immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 2, p. 283–288, 2012.

WHITFIELD, J. F.; MORLEY, P.; WILLICK, G. E. The bone-building action of the parathyroid hormone. Implications for the treatment of osteoporosis. **Drugs and Aging**, v. 15, n. 2, p. 117–129, 1999.

WORBS, T.; HAMMERSCHMIDT, S. I.; FÖRSTER, R. Dendritic cell migration in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 30–48, 2017.

XIAO, W. et al. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. **Frontiers of Oral Biology**, v. 18, p. 9–16, 2015.

XIAO, W. et al. Bone fracture healing is delayed in splenectomic rats. **Life Sciences**, v. 173, p. 55–61, 2017.

XIAO, W. et al. Splenectomy delays fracture healing by affecting the level of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and bone morphogenetic protein. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 27, n. 2, p. 165–171, 2018.

XIONG, J. et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2015.

YANAGIHARA, G. R. et al. Efeitos da administração em longo prazo do omeprazol sobre a densidade mineral óssea e as propriedades mecânicas do osso. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 2, p. 232–238, 2015.

YANAGIHARA, G. R. et al. High-impact exercise in rats prior to and during suspension can prevent bone loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 3, p. 1–8, 2016.

YANG, L. et al. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 33, p. 12097–12102, 2014a.

YANG, P. F. et al. Torsion and antero-posterior bending in the in vivo human tibia loading regimes during walking and running. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014b.

YASUDA, H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 1, p. 2–11, 2021.

YOKOTA, H.; TANAKA, S. M. Osteogenic potentials with joint-loading modality. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 302–308, 2005.

YUAN, Y.; CHAI, Y. Regulatory mechanisms of jaw bone and tooth development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 133, p. 91–118, 2019.

ZEBAZE, R. M. et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. **The Lancet**, v. 375, n. 9727, p. 1729–1736, 2010.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. TGF- β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. **Nature Immunology**, v. 13, n. 7, p. 667–673, 2012.

ZIMMERMANN, E. A. et al. Fracture resistance of human cortical bone across multiple length-scales at physiological strain rates. **Biomaterials**, v. 35, n. 21, p. 5472–5481, 2014.

11. ANEXO 1 (Aprovação CEUA):



Universidade Federal
São João del-Rei

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS SISTÊMICOS DE TOLERÂNCIA ORAL NO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO TARDIA DE DEFEITO ÓSSEO EM RATOS WISTAR.", protocolada sob o CEUA nº 9802240321 (000001), sob a responsabilidade de **Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga**, e equipe; **Alisson Kennedy Rezende**; **Álvaro César de Oliveira Penoni**; **Raquel Alves Costa**; **Bruno Henrique Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João del-Rei (CEUA/UFSJ) na reunião de 31/03/2021.

We certify that the proposal "SYSTEMIC EFFECTS OF ORAL TOLERANCE ON THE LATE HEALING BONE PROCESS IN WISTAR RATS.", utilizing 288 Heterogenics rats (288 males), protocol number CEUA 9802240321 (000001), under the responsibility of **Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga**, and team; **Alisson Kennedy Rezende**; **Álvaro César de Oliveira Penoni**; **Raquel Alves Costa**; **Bruno Henrique Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São João del-Rei Federal University (CEUA/UFSJ) in the meeting of 03/31/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2021** a **12/2023** Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **Núcleo de criação de animais de laboratório**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **03 a 12 semanas** N: **288**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **020 a 030 g**

Local do experimento: Sala B 1.11b DCNAT Universidade Federal de São João del Rei [] UFSJ - Campus Dom Bosco [] CDB - Praça Dom Helvécio, 74 [] Fábricas -36301-160 - São João del Rei - MG [] departamento de Ciências Naturais (biotério, fazenda, aviário, etc.).

São João del-Rei, 27 de julho de 2021

Gilcélio Amaral da Silveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São João del-Rei

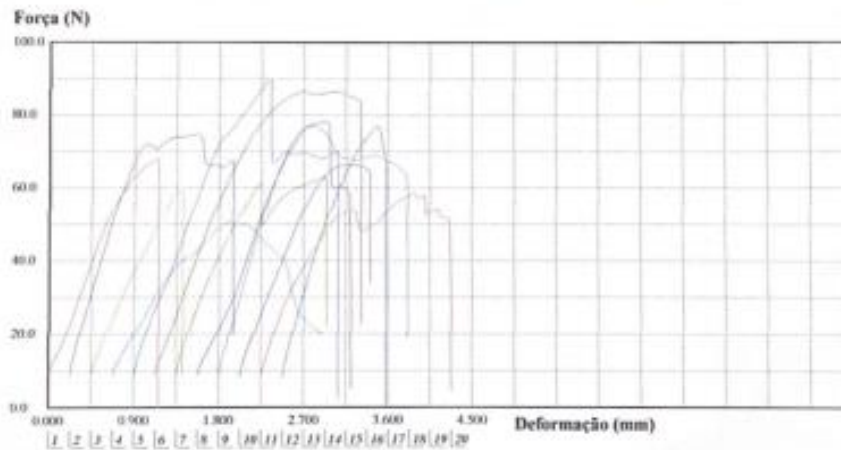
Michel Alves da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São João del-Rei

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Laboratório de Bioengenharia

Relatório de Ensaio

Máquina: Emic DL10000 Célula: Trd 28 Extensômetro: - Data: 24/11/2021 Hora: 16:05:28 Trabalho nº **0394**
 Programa: Test versão 3.04 Método de Ensaio: **Cisalhamento**
 Ident. Amostra: ***** Osso: **Tíbia com defeito - 45 dias** Ensaio: **Flexão biapoiada** Grupo: **Al(OH)3**

Corpo de Prova	Ident.	Força Máxima (N)	Deformação (mm)	Rig. Estat (N/mm)	E. Final (N.mm)
CP 1	1	68,14	1,153	58,80	51,32
CP 2	2	74,98	1,331	58,05	75,10
CP 3	3	59,44	0,955	54,91	35,86
CP 4	4	50,79	1,218	35,92	41,05
CP 5	5	89,85	1,437	60,57	81,19
CP 6	6	86,69	1,939	48,13	122,04
CP 7	7	63,12	1,581	37,47	75,55
CP 8	8	78,40	1,369	59,16	68,09
CP 9	9	77,17	1,029	75,94	53,24
CP 10	10	66,54	1,245	53,74	58,09
CP 11	11	58,70	1,621	31,71	71,24
CP 12	12	77,28	1,014	73,19	50,89
Numero CPs	0	12	12	12	12
Média	*	70,93	1,324	53,97	65,31
Desv Padrão	*	11,81	0,2882	13,79	22,90
Coef Var (%)	*	16,64	21,76	25,55	35,07
Máximo	*	89,79	0,9546	31,71	35,86
Mínimo	*	89,85	1,939	75,94	122,0



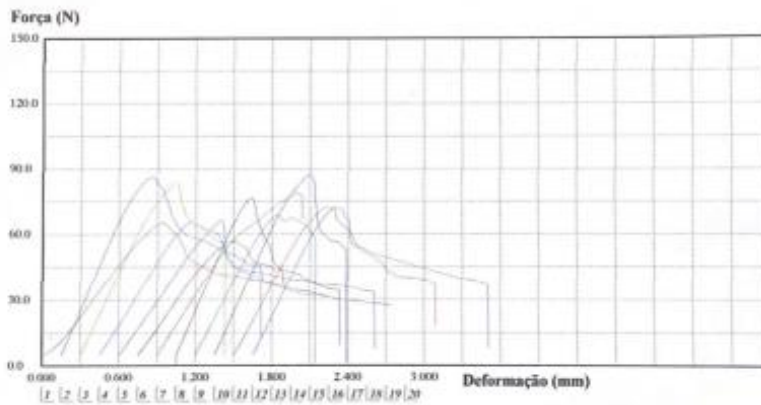
Laboratório de Bioengenharia

Ensaio de flexão em três pontos

Relatório de Ensaio

Máquina: Emic DL10000 Célula: Trd 28 Extensômetro: - Data: 24/11/2021 Hora: 12:51:16 Trabalho nº 0392
 Programa: Test versão 3.04 Método de Ensaio: Tibia - Mauricio
 Ident. Amostra: Grupo: Salina Osso: Tibia Lateralidade: Esquerdo

Corpo de Prova	Ident	Força Máxima (N)	Desl. Fmax (mm)	Rig_80% (N/mm)
CP 1	1	65,58	0,95	77,85
CP 2	2	86,29	0,71	140,83
CP 3	3	83,47	0,76	124,97
CP 4	4	66,03	0,72	95,20
CP 5	5	66,72	0,89	83,99
CP 6	6	57,04	0,75	84,25
CP 7	7	78,77	1,09	91,49
CP 8	8	76,78	0,58	138,62
CP 9	9	69,00	0,65	114,23
CP 10	11	87,33	0,76	131,74
CP 11	12	72,33	0,73	111,18
CP 12	13	72,40	0,64	121,81
Número CPs	0	12	12	12
Média	*	73,48	0,7618	109,6
Desv.Padrão	*	9,298	0,1374	22,38
Coef.Var (%)	*	12,65	18,03	20,42
Mínimo	*	57,04	0,5845	77,85
Máximo	*	87,33	1,090	140,8



Observação: Obs.: Força aplicada no sentido antero-posterior