

# MONITORAMENTO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FOSFATASE ALCALINA, CÁLCIO E FÓSFORO APÓS OSTEOTOMIA EXPERIMENTAL EM OVINOS

## *MONITORING SERUM ALKALINE PHOSPHATASE, CALCIUM, AND PHOSPHORUS LEVELS FOLLOWING EXPERIMENTAL OSTEOTOMY IN SHEEP.*

T. S. P. M. KOGA<sup>1</sup>; G. M. MARCONDES<sup>2</sup>; A. L. V. ZOPPA<sup>3</sup>

### RESUMO

Diante da necessidade de acompanhar o processo de remodelamento ósseo em animais em recuperação de fraturas pode-se utilizar o auxílio de marcadores ósseos. Estes podem ser mensurados na urina, ou no sangue (plasma ou soro), refletindo assim o que acontece no organismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de marcadores do metabolismo ósseo no processo de regeneração de falhas ósseas em ovelhas submetidas à osteotomia circular em III/IV metacarpianos. Avaliar a correlação entre o período de regeneração óssea e dosagem sérica de fósforo, fosfatase alcalina e cálcio. Foram realizadas coletas semanais de sangue até completarem oito semanas para avaliar os níveis séricos de fosfatase alcalina, fósforo e cálcio de 12 ovelhas submetidas à osteotomia na face dorso-medial do terço proximal em ambos III e IV metacarpianos, sendo que um dos membros recebeu implante de manta óssea a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, no local da falha induzida cirurgicamente e o outro membro não, sendo considerado o controle. Observou-se correlação entre valores de fosfatase alcalina acima do nível da coleta no momento pré-operatório com significância estatística em D42 (valor de  $p = 0,03248$ ), D49 (valor de  $p = 0,00032$ ) e D56 (valor de  $p = 0,000021$ ) em relação a D7 (que apresentou o menor valor médio de fosfatase alcalina). Com base nos resultados sugere-se aumento na concentração sérica média de fosfatase alcalina total, que pode estar correlacionado ao pico da fase inflamatória do processo de reparação óssea, sugerindo que a fosfatase alcalina total possa ser usada como marcador.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomarcadores. Biomaterial. Falha óssea. Ovelha. Remodelação óssea.

### SUMMARY

Given the need to monitor the bone remodeling process in animals recovering from fractures, bone markers can be used to aid in this process. Bone markers in urine or blood (plasma/serum) reflect bone remodeling during fracture healing. This study investigated their role in sheep with circular osteotomy of the third and fourth metacarpals. Specifically, it assessed the correlation between bone regeneration time and serum levels of phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), and calcium. Twelve sheep underwent osteotomy on the proximal third, dorso-medial surface of both metacarpals. One limb received a chitosan-hydroxyapatite-collagen bone mat implant, while the other served as the control. Weekly blood samples were collected over eight weeks to measure serum ALP, phosphorus, and calcium. ALP levels showed a significant increase above preoperative values at day 42 ( $p = 0.03248$ ), day 49 ( $p = 0.00032$ ), and day 56 ( $p = 0.000021$ ) compared to day 7 (lowest average ALP). These results suggest an increase in average serum ALP concentration, potentially correlating with peaks during the inflammatory phase of bone repair. This finding indicates the potential utility of ALP as a marker for bone healing.

**KEY-WORDS:** Biomarkers. Biomaterial. Bone blanket. Bone turnover. Sheep.

---

<sup>1</sup> Mestranda do departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ USP)

\*Autora para correspondência: [thamires.mizobe@usp.br](mailto:thamires.mizobe@usp.br)

<sup>2</sup> Professora Dra. da UNIEDUK

<sup>3</sup> Prof. Dr. Do departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ USP)

## INTRODUÇÃO

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são substâncias que retratam formação e reabsorção ósseas, sendo que o processo de formação é dependente da ação dos osteoblastos. Os marcadores de formação óssea mensuram produtos resultantes destas células, e os de reabsorção, a ação dos osteoclastos. Ambos os processos estão estritamente ligados, ou seja, um marcador que reflete a reabsorção consequentemente refletirá a formação (VIEIRA, 1999).

Animais oostectomizados devido a desvios angulares ou de forma experimental, tem a retirada de um segmento ósseo do local a ser tratado (AUER; STICK, 2012; FOSSUM, 2021).

Diante da necessidade de acompanhar o processo de remodelamento ósseo em animais em recuperação de fraturas, falhas induzidas, e até mesmo o fenômeno em si de remodelação e reabsorção óssea, pode-se utilizar o auxílio de marcadores ósseos. Estes marcadores podem ser mensurados na urina, ou no sangue (plasma ou soro), refletindo assim o que acontece no organismo do animal (CARDOSO et al., 2010; CAMASSA et al., 2017).

Segundo Kaneko (1997) a ação da fosfatase alcalina total sérica é a combinação de isoenzimas produzidas no fígado, osso, rim, placenta e intestino. As isoenzimas produzidas no fígado e no osso representam a maior fração. A fosfatase alcalina óssea está presente na membrana das células do osteoblasto e é liberada por um mecanismo ainda não elucidado durante a formação óssea.

A forma óssea da fosfatase alcalina tem maior predominância na infância até o fim do crescimento longitudinal, sendo que depois disso, a forma hepática será mais circulante (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Para que haja associação da elevação da fosfatase alcalina óssea, os fenômenos ósseos devem ser de grande magnitude, como numa fratura, por exemplo, sendo assim utilizada como marcador de atividade de doença ou parâmetro de resposta ao tratamento instituído (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Segundo Swenson e Reece (1996) e Ciosek et al. (2021), o cálcio e o fósforo funcionam como principais elementos estruturais do tecido ósseo, estando mais de 99%

do total do cálcio corporal e mais de 75% do total do fósforo, nos ossos e dentes. Eles estão presentes no osso, principalmente como sais de apatita e como fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. Além de ser o arcabouço estrutural, os ossos também são reserva corporal de cálcio e fósforo. Durante os períodos de deficiência alimentar ou quando as necessidades aumentam, o cálcio e o fósforo são rapidamente mobilizados dos ossos para manter os níveis normais.

O fósforo está relacionado em processos metabólicos, incluindo os que envolvem os tampões nos fluidos corporais (SWENSON; REECE, 1996; CIOSEK et al., 2021).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 ovelhas fêmeas adultas não prenhes, com idade de 4 anos, híbridas da raça Santa Inês, oriundas do município de Jarinú- S.P. Os animais foram alimentados à base de feno de tifton e água a vontade, além de ração comercial peletizada, levando em consideração uma dieta de manutenção. Os animais foram mantidos em regime de estabulação por todo o período de estudo.

Os animais foram identificados e vacinados contra clostridioses e vermifugados de acordo com o peso vivo com moxidectina.

Exames laboratoriais pré-operatórios como perfil renal, hepático e hemograma completo, além de dosagem sérica de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram realizados sete dias antes do procedimento cirúrgico, sendo considerado (D0). Foi realizada a ostectomia circular unicortical na face dorso-medial do osso metacarpiano III e IV (MARCONDES et al., 2015). De forma randomizada, 3 animais continham biomaterial no membro direito e 3 animais continham biomaterial no membro esquerdo, com o membro contralateral servindo de controle. Foram realizadas colheitas de sangue para mensuração sérica de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina total semanalmente, até completarem 8 semanas de pós-operatório (Tabela 1). A coleta de sangue foi realizada através venopunção jugular, em tubo seco. Foi utilizada somente a fração sérica e para sua obtenção o material foi centrifugado por 5 minutos em rotação de 3500 rpm.

**Tabela 1-** Período de coleta.

| Pré-operatório | 7 dias de pós<br>cirúrgico | 15 dias de<br>pós<br>cirúrgico | 21 dias de<br>pós<br>cirúrgico | 28 dias de<br>pós<br>cirúrgico | 35 dias de<br>pós<br>cirúrgico | 42 dias de<br>pós<br>cirúrgico | 49 dias de<br>pós<br>cirúrgico | 56 dias de<br>pós<br>cirúrgico |
|----------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| D0             | D1                         | D2                             | D3                             | D4                             | D5                             | D6                             | D7                             | D8                             |

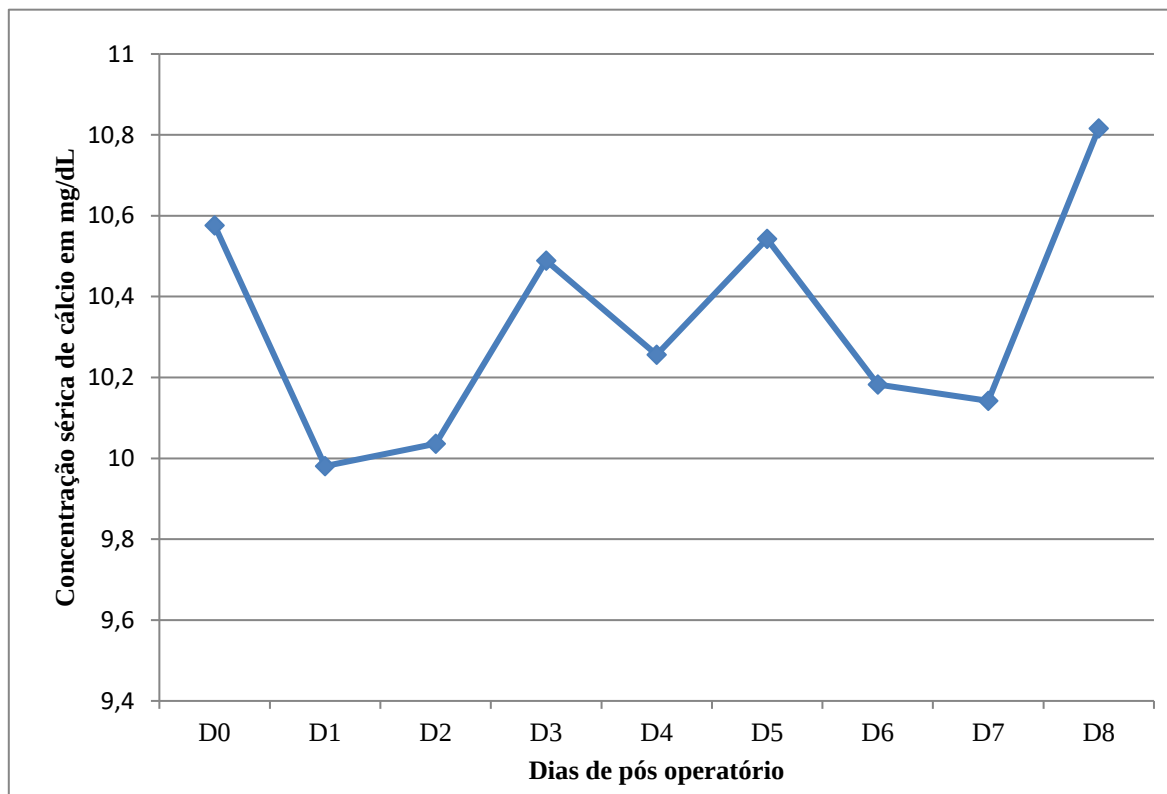
O soro foi armazenado em *ependorf* translúcidos, previamente identificados com o número e data da coleta de cada animal.

Após centrifugação, a porção sérica da amostra foi analisada pelo kit Biosistem por análise enzimática e

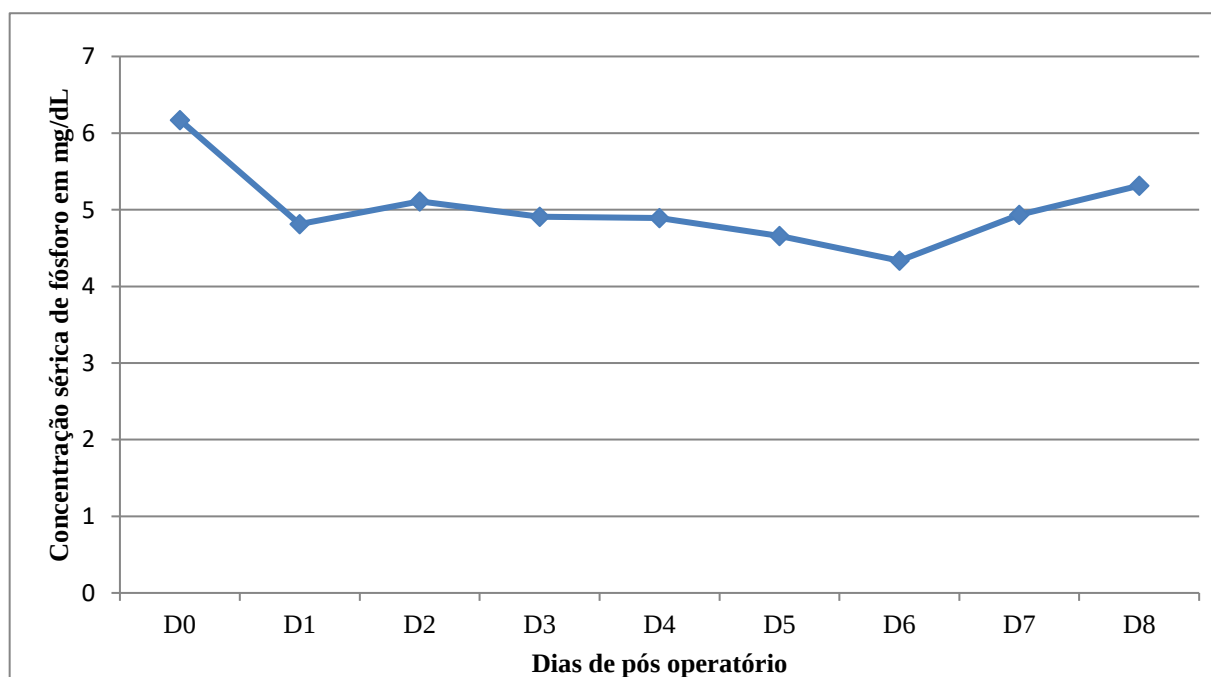
colorimétrica, feita no aparelho LABMAX 240® para fosfatase alcalina, fosfato e cálcio.

Os gráficos de cálcio (Gráfico 1), fosforo (Gráfico 2) e fosfatase alcalina total (Gráfico 3) foram elaborados a partir das médias obtidas no programa Excel, permitindo a avaliação desses parâmetros ao longo do tempo.

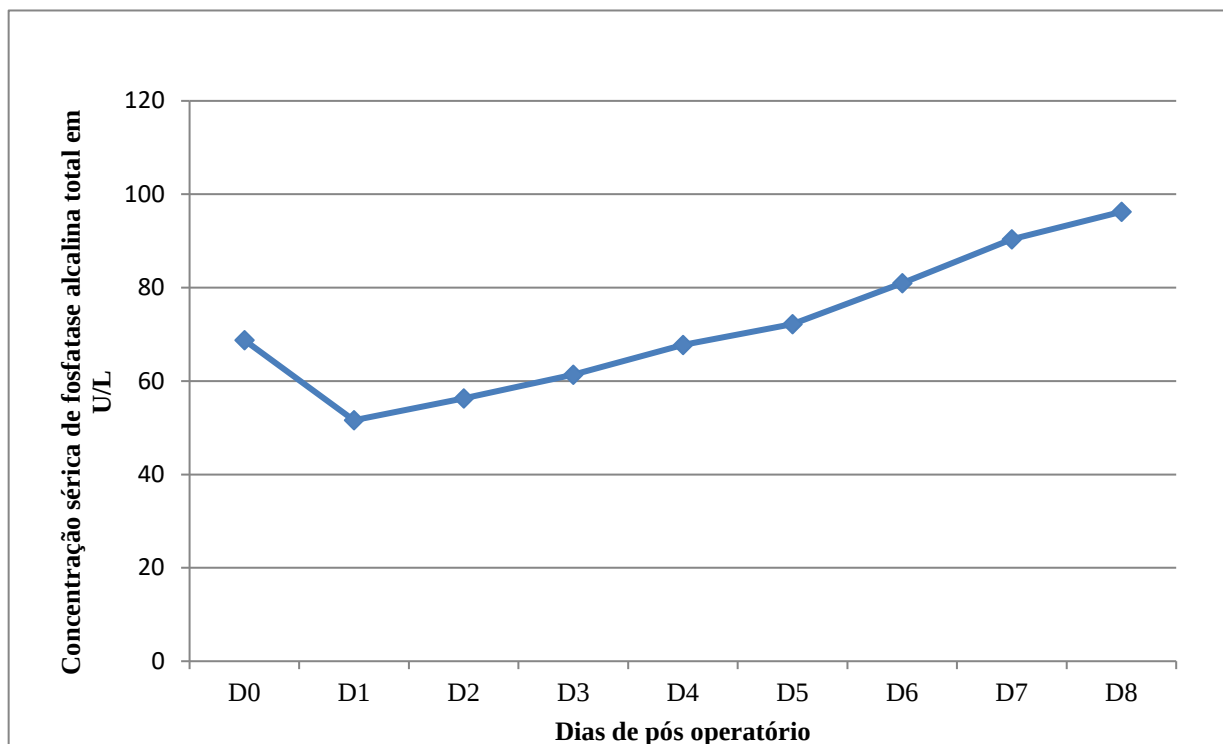
**Gráfico 1** - Concentração Sérica de Cálcio (mg/dL) média por dia de colheita.



**Gráfico 2** - Concentração Sérica de Fósforo (mg/dL) média por dia de colheita.



**Gráfico 3** - Concentração Sérica de Fosfatase Alcalina Total (U/L) média por dia de colheita.



Os resultados foram submetidos a avaliação estatística, utilizando-se do programa R (R Core Team, 2014) e o pacote PMCMR (POHLER, T., 2014). Primeiramente foi realizado teste de normalidade para ver se as amostras apresentavam distribuição normal. Como nem todas as amostras seguiram uma distribuição Normal (valor de  $p < 0,05$ ) recomendou-se o uso de um teste não paramétrico. A partir destes dados, foi possível fazer análise estatística baseada no teste de Friedman (FRIEDMAN, M., 1937) em conjunto com o Teste Post-Hoc de Nemenyi (DEMSAR, J., 2006) com nível de Significância ( $\alpha$ ) considerado de 0,05.

## RESULTADOS

O Teste de Friedman indicou uma diferença significativa nos níveis de cálcio ao longo do tempo ( $p = 0,001803$ ). A análise post-hoc de Nemenyi revelou que essa diferença ocorreu entre os momentos D2 e D5 (valor de  $p = 0,023$ ) e os momentos D2 e D8 (valor de  $p = 0,026$ ).

Ainda, o Teste de Friedman indicou diferença significativa na concentração de fósforo ao longo dos momentos ( $p = 0,003054$ ). O teste Post-Hoc de Nemenyi indicou que esta diferença ocorreu entre os momentos Pré e D5 (valor de  $p = 0,03651$ ) e os momentos Pré e D6 (valor de  $p = 0,00072$ ).

A fosfatase alcalina também apresentou diferença significativa em sua concentração através do Teste de Friedman ( $p = 0,000005397686$ ). Através do Teste Post-Hoc de Nemenyi localizamos que essa diferença ocorreu entre os momentos D1 e D6 (valor de  $p = 0,03248$ ); os momentos D1 e D7 (valor de  $p = 0,00032$ ); os momentos D1 e D8 (valor de  $p = 0,000021$ ); os momentos D2 e D8

(valor de  $p = 0,00915$ ); e os momentos D3 e D8 (valor de  $p = 0,00915$ ).

Ao comparar os gráficos das médias de cada um dos marcadores com seus respectivos valores de significância estatístico após aplicação dos devidos testes pôde-se observar uma correlação entre um leve decréscimo da curva de fósforo com o D5, seguido de leve acréscimo da curva em D6; valores de fosfatase alcalina acima do nível da coleta em pré-operatório no gráfico correlacionado com significância estatística em D6, D7 e D8 em relação a D1 (que apresentou o menor valor médio de fosfatase alcalina) e em relação ao exame pré-operatório (valor inicial).

## DISCUSSÃO

Segundo Pugh (2004) os valores normais de cálcio para ovelhas adultas não prenhes deveriam ser de 11,5 a 12,8 mg/dL, mas os valores obtidos encontravam-se abaixo do normal para a espécie que variavam de  $10,34 \pm 0,71$  mg/dL, com decréscimo maior após intervenção cirúrgica devido à atividade remodeladora óssea. Seebeck et al. (2005) encontrou valores de concentração média do cálcio ligeiramente maiores entre a 4ª e a 5ª semana após a realização de defeito ósseo de 3 mm na tíbia de ovinos. No caso do fósforo, não houve mudança mantendo os valores séricos próximos da normalidade que deveriam ser de 5,0 a 7,3 mg/dL, e os valores encontrados neste experimento foram de  $5,01 \pm 1,25$  mg/dL (PUGH, 2004).

No atual estudo, a concentração de fosfatase alcalina total sérica foi em torno de  $71,73 \pm 40,27$ , com diferença estatística entre o momento D2 e D8 e início do aumento da média da concentração de fosfatase alcalina

entre os momentos D1 e D2, e em D3 e D8. Esses resultados condizem com achados de Marcondes et al. (2015), que observou um pico do aumento de temperatura na termografia em ovinos adultos, fêmeas submetidas à osteotomia de III/ IV metacarpianos com 14 a 21 dias de pós-operatório, o que pode estar relacionado ao pico da fase inflamatória do processo de reparação óssea nessa espécie. Seebeck et al. (2005) encontraram diminuição do valor de fosfatase alcalina durante o período de regeneração óssea pós fratura (entre a 5ª e 9ª semana de pós-operatório).

Segundo Nóbrega (2014), em equinos submetidos à osteotomia e sujeitos a implante de biomaterial de outra natureza, foi encontrado pico de fosfatase alcalina sérica total com 30 dias de pós-operatório, mas, sem o aumento de temperatura termograficamente em mesmo período. No presente estudo, observou-se aumento da concentração da fosfatase alcalina total sérica em mesmo momento que Marcondes et al. (2015) observou um aumento da temperatura termográfica em ovinos (D5). Além disso, os ovinos apresentaram sinais de regeneração óssea em menor tempo de pós-operatório (entre 14 e 21 dias) do que os equinos (com 30 dias de pós-operatório). Em humanos, o pico de fosfatase alcalina é encontrado em torno da 7ª semana pós fratura, retornando ao valor basal no final da consolidação (CHAUDHARY et al., 2021).

## CONCLUSÃO

Foi encontrado aumento na concentração sérica média de fosfatase alcalina total, que pode estar correlacionado ao pico da fase inflamatória do processo de reparação óssea, demonstrando que a fosfatase alcalina total pode ser usada como marcador, porém, o uso de outros marcadores de formação óssea como osteocalcina, ou fosfatase alcalina óssea, por exemplo, poderiam mostrar com mais clareza o comportamento ósseo isoladamente.

## REFERÊNCIAS

- AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine Surgery**. 4a. ed. Missouri: Elsevier, 2012.
- CAMASSA, J. A.; DIOGO, C. C.; SOUSA, C. P.; AZEVEDO, J. T.; VIEGAS, C. A.; REIS, R. L.; DOURADO, N.; DIAS, I. R. Bone turnover markers in sheep and goat: A review of the scientific literature. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 231–245, 2017.
- CARDOSO, M. J. L.; COSTA, F. S.; MUNIZ, L. M. R.; MELUSSI, M.; VALÉRIO, M. A. Marcadores do metabolismo ósseo em gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1765-1769, ago. 2010.
- CHAUDHARY, D. S.; SOLANKI, J. J.; VERMA, T.; CHAVALI, V. H. Monitoramento da evolução do tratamento da ausência de consolidação da fratura: Papel da fosfatase alcalina e da ultrassonografia. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 56, n. 06, p. 796–803, 2021.
- CIOSEK, Ž.; KOT, K.; KOSIK-BOGACKA, D.; ŁANOCHA-ARENDARCZYK, N.; ROTTER, I. The

effects of calcium, magnesium, phosphorus, fluoride, and lead on bone tissue. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, 2021.

DEMSAR, J. Statistical comparisons of classifiers over multiple data sets. **Journal of Machine Learning Research**, n. 7, 1-30, 2006.

DIAS, I. R.; VIEGAS, C. A.; DE AZEVEDO, J. T.; COSTA, E. M.; LOURENÇO, P.; RODRIGUES, A.; CABRITA, A. S. Assessment of markers of bone formation under controlled environmental factors and their correlation with serum minerals in adult sheep as a model for orthopaedic research. **Laboratory Animals**, v. 42, n. 4, p. 465-472, 2008.

FRIEDMAN, M. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. **Journal of the American Statistical Association**, n. 32, 675-701, 1937.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 5a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

MARCONDES, G. D. M.; NÓBREGA, F. S.; PEDRON, B. G.; GAIDO, S. R.; CARLO, S.; HAGEN, F.; ZOPPA, A. L. V. A. Utilização de métodos não invasivos de imagem para avaliação da regeneração óssea em falhas ósseas induzidas experimentalmente em III / IV metacarpianos de ovinos \*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. November, p. 1319, 2015.

NÓBREGA, F. S. **Avaliação da interação biológica entre o polímero de poliuretano de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos**. 2014. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PARETSIS, N. F.; BACCARELLI, D. C.; LHAMAS, C. L.; ALONSO, D. C.; NÓBREGA, F. S.; ZOPPA, A. L. V. Osteotomia De Tíbia Em Modelo Experimental Ovíno Para Estudo De Regeneração Óssea. **Ars Veterinaria**, v. 32, n. 1, p. 01–08, 2016.

POHLER, T. The pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR).R.package, 2014.

PUGH, D. C. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 513 p, 2005.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.

SARAIVA G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, 2002.

SEEBECK, P.; BAIL, H. J.; EXNER, C.; SCHELL, H.; MICHEL, R.; AMTHAUER, H.; BRAGULLA, H.; DUDA, G. N. Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing? **Bone**, v. 37, n. 5, p. 669–677, 2005.

SWENSON, M. J.; REECE, W.O. **Dukes**: fisiologia dos animais domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, 1999.