



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA**  
**MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**ALINE AMARAL IMBELONI**

**ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NO METABOLISMO ÓSSEO DE**  
**Chlorocebus aethiops MANTIDOS EM CATIVEIRO**

**Belém – Pará**  
**2015**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA**  
**MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**ALINE AMARAL IMBELONI**

**ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NO METABOLISMO ÓSSEO DE  
*Chlorocebus aethiops* MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Clínica de pequenos e animais silvestres, para obtenção do título de Mestre.  
Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro  
Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sheila Canevese Rahal e Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

**Belém – Pará**  
**2015**

---

Imbeloni, Aline Amaral

Análise dos marcadores bioquímicos no metabolismo ósseo de *Chlorocebus aethiops* mantidos em cativeiro / Aline Amaral Imbeloni. - Belém, 2015.

43 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

1. Primatas 2. Formação óssea – marcador 3. Reabsorção óssea – marcador I. Título.

CDD – 599.8

---



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA**  
**MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**ALINE AMARAL IMBELONI**

**ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS NO METABOLISMO ÓSSEO DE  
CHLOROCEBUS AETHIOPS MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Análises clínicas de Primatas não humanos, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 28 de abril de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro – Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Vivina Barros Monteiro – 1<sup>º</sup> Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Sheyla Farahyldes Souza Domingues – 2<sup>º</sup> Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

---

Prof. Dr. Luiz Marcelo de Lima Pinheiro – 3<sup>º</sup> examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ter estado ao meu lado e pela oportunidade que Ele nos dá, no momento certo. Agradeço a Virgem Maria pela Sua proteção e intercessão perante Deus.

À minha família, meu pai Ernesto, minha mãe Celina, e minhas irmãs, Daniella e Maria Laura que apesar do momento difícil, nossa família continuou mais unida do que nunca. Agradeço pelo apoio, as orações e a dedicação para a conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Luiz Paulo por todas as etapas vencidas juntos, pelo apoio, paciência, companheirismo dedicado sempre e pelo acompanhamento nas análises estatísticas.

Ao meu querido avô Armênio (in memoriam), e minha avó Laura por todos os ensinamentos. Agradeço a toda família AMARAL e IMBELONI pelo apoio e confiança.

Ao Frederico Monteiro, pela orientação, ensinamentos e amizade dedicada durante a execução deste projeto. A co-orientadora Sheila Rahal que mesmo longe, dedicou seu tempo para as orientações e correções. Ao co-orientador Ednaldo da Silva Filho pelo apoio e paciência para explicar e realizar as análises estatísticas.

Ao Centro Nacional de Primatas pela oportunidade de realizar o projeto. A toda equipe que participou da execução do projeto, Manoella, Mika, Sheila, Karol, Sarah, Monique, Keila, Obadias, Camila, Lorena, Max, Marco Antônio, Rosa, Miguel e principalmente ao Paulo-x pela imensa ajuda. Agradeço muito pelo esforço, paciência e dedicação de todos da equipe. Ao Wellington Bandeira, pela amizade, apoio, sempre com soluções e boas ideias para o projeto.

A Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia pelo apoio e oportunidade.

“A vontade de Deus nunca irá levá-lo aonde a Graça Dele não irá protegê-lo”

Chico Xavier

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**MBO:** Marcadores Bioquímicos Ósseos

**OC:** Osteocalcina

**PINP:** Propeptídeo Aminoterminal do Pró-colágeno Tipo I

**$\beta$ -CTX:**  $\beta$ -crosslaps

**PTH:** Paratormônio

**SIV:** Vírus da Imunodeficiência Símia

**GLA:** Ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico

**CTX:** Telopectídeos do Terminal C de Colágeno Tipo I

**PCA:** Carcinoma de Paratireóide

**FE:** Faixa Etária

**PNH:** Primatas Não Humanos

**AIDS:** Acquired Immune Deficiency Syndrome

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus

**CONCEA-MCT:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal -  
Ministério da Ciência e Tecnologia

**CEUA-IEC:** Comissão de Ética no Uso de Animais - Instituto Evandro Chagas

**CENP:** Centro Nacional de Primatas

**INMET:** Instituto Nacional de Meteorologia

**IM:** Intramuscular

**ICTP:** Telopectídeo Carboxiterminal do Colágeno Tipo I

**CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**DP:** Desvio Padrão

♂: Macho

♀: Fêmea

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Indivíduos da espécie *Chlorocebus aethiops*.....**15**

**Figura 2:** Correlação entre os níveis sorológicos de biomarcadores ósseos em função da idade (anos) de *Chlorocebus aethiops* (N = 73). (A) Propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP,  $r = -0.643$ ,  $P < 0.001$ ); (B) Osteocalcina (OC,  $r = -0.711$ ,  $P < 0.001$ ); (C)  $\beta$ -crosslap ( $\beta$ -CTX,  $r = -0.488$ ,  $P < 0.001$ ); (D) Paratormônio (PTH,  $r = 0.418$ ,  $P < 0.001$ ).....**43**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Intervalos de referência (Mínimo – Máximo) das concentrações de marcadores ósseos de *Chlorocebus aethiops* (N = 73), com margem de confiança de 95%.....**41**

**Tabela 2:** Média  $\pm$  desvio padrão (DP) da massa corporal e dos marcadores ósseos de *Chlorocebus aethiops*, (N = 73), de acordo com o sexo e faixa etária (FE).....**42**

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 ESPÉCIE .....	14
2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ÓSSEO .....	15
2.2.1 Propeptídeo Aminoterminal do Pró-Colágeno Tipo I (PINP) .....	16
2.2.2 Osteocalcina (OC).....	17
2.2.3 <i>β-crosslaps</i> ( <i>β</i> -CTX) .....	18
2.2.4 Paratormônio (PTH).....	19
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>20</b>
<b>EFEITO DA IDADE E SEXO NOS MARCADORES ÓSSEOS EM CHLOROCEBUS AETHIOPS MANTIDOS EM CATIVEIRO.....</b>	<b>26</b>
INTRODUÇÃO .....	27
MATERIAL E MÉTODOS .....	29
Animais e condições de manejo .....	29
Contenção e exame hematológico.....	30
Análise estatística.....	31
RESULTADOS .....	32
DISCUSSÃO .....	32
REFERÊNCIAS.....	36

## RESUMO

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo vêm sendo utilizados na prática clínica em inúmeras doenças ósseas metabólicas. Eles quantificam substâncias do processo metabólico em curso no tecido ósseo, o que facilita a descoberta precoce de doenças, prevenindo fraturas, auxiliando no acompanhamento do tratamento e na decisão terapêutica. Assim, objetivou-se propor uma descrição da variação dos marcadores ósseos propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), a osteocalcina (OC), o  $\beta$ -crosslaps ( $\beta$ -CTX) e o paratormônio (PTH) em *Chlorocebus aethiops*, criados em cativeiro, avaliando o efeito do sexo e da idade. Foram utilizados 73 indivíduos do Centro Nacional de Primatas – CENP, sendo 36 machos e 37 fêmeas, distribuídos em quatro faixas etárias (FE): FE 1 (infanto-juvenil - 1 a 3 anos); FE 2 (adulto jovem - 6 a 9 anos); FE 3 (adulto - 10 a 15 anos); FE 4 (idoso - 20 a 25 anos). Os marcadores foram dosados no soro sanguíneo, utilizando a técnica de imunoenensaio eletroquioluminescente. O sexo não influenciou nos resultados dos biomarcadores. No entanto, os parâmetros de OC, PINP,  $\beta$ -CTX, apresentaram correlação negativa com a idade (FE1>FE2, FE3 e FE4). O PTH apresentou correlação foi positiva com a idade, sendo FE4>FE1, FE2, FE3. Os dados obtidos podem ser utilizados como intervalos de referência de biomarcadores do metabolismo ósseo, a partir de *C. aethiops* saudáveis em cativeiro.

**PALAVRAS - CHAVE:** Primatas, Formação óssea – marcador, Reabsorção óssea – marcador

## ABSTRACT

Biochemical markers of bone metabolism have been used in clinical practice in several metabolic bone diseases. They quantify substances from metabolic process in progress in the bone tissue, which facilitates the early detection of diseases, preventing fractures, helping in monitoring the treatment and therapeutic decision. Therefore, the objective was to propose a description of changes in bone markers amino-terminal propeptide of procollagen type I (PINP), osteocalcin (OC), the  $\beta$ -CrossLaps ( $\beta$ -CTX) and parathyroid hormone (PTH) in *Chlorocebus aethiops* bred in captivity, evaluating the effect of sex and age. We used 73 individuals from the National Primate Center - CENP, 36 males and 37 females, divided into four age groups (FE): FE 1 (juvenile - 1-3 years); FE 2 (young adult - 6-9 years); FE 3 (adult - 10 to 15 years); FE 4 (aged - 20 to 25 years). The markers were measured in serum using the immunoassay technique eletroquoluminescente. Gender did not influence the results of biomarkers. However, the parameters OC, PINP,  $\beta$ -CTX were negatively correlated with age (FE1 > FE2, FE3 and FE4). PTH was correlated positively with age, being FE4 > FE1, FE2, FE3. The data obtained can be used as biomarkers of bone metabolism reference intervals from healthy *C. aethiops* in captivity.

**KEYWORDS:** Primates, Bone formation - marker, Bone resorption - marker

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O metabolismo ósseo é um processo equilibrado em condições normais e variável de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento, podendo ser alterado em doenças ósseas ou sistêmicas (Vargas et al., 1997). O tecido ósseo está constantemente sujeito à remodelagem, mediada pela ação dos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos em um processo de formação e reabsorção óssea (Riggs, 1991). Em estados anormais do metabolismo, estes processos tornam-se desproporcionais e, quando a reabsorção é superior a formação, o resultado é a perda óssea, que pode resultar em osteopenia ou outras perturbações do tecido ósseo (Price, 1993).

Inúmeras doenças ósseas metabólicas acometem os primatas não humanos do velho mundo, principalmente relacionadas com o avanço da idade, a exemplo das osteoartrites (Duncan et al., 2012), osteopenia (Cerroni et al., 2000), osteófitos, espondiloses (Hernández-Godínez et al., 2010) e osteoporose (Cerroni et al., 2000; Hernández-Godínez et al., 2010). Dessas, a osteoporose, caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea, pode estar relacionada ainda com a redução dos níveis de estrógeno em mulheres (Wheater et al., 2013) e em fêmeas de primatas não humanos (Reinwald e Burr, 2008), ocasionando fragilidade óssea e, conseqüentemente, aumento do risco de fraturas (Gertz et al., 1994).

Contudo, esses fenômenos metabólicos, fisiológicos e patológicos que atingem o tecido ósseo só afetam significativamente a estrutura radiopaca após um período de tempo considerável, o que torna o emprego de técnicas de imagem limitadas para o estudo mais dinâmico e a curto prazo. Por isso o interesse na utilização de marcadores bioquímicos ósseos (MBO). Essa metodologia quantifica substâncias que representam processos metabólicos em curso no tecido ósseo (Vieira, 1999), realizada pela caracterização dos componentes intracelulares e extracelulares da matriz óssea (Seibel, 2006).

Com maior sensibilidade para diagnosticar doenças ósseas metabólicas, por método pouco invasivo, os MBO auxiliam na descoberta precoce de doenças, prevenindo fraturas, na decisão terapêutica, no acompanhamento e controle do tratamento (Vargas et al., 1997; Belic, 2012). No entanto, a variabilidade biológica é a principal desvantagem na utilização dos marcadores ósseos, e pode ser afetada por fatores como: idade, sexo, nutrição, exercício e doenças sistêmicas (Souberbielle et al, 1997; Havill et al., 2006; Banfi et al., 2010; Belic et al., 2012; Tortora e Derrickson, 2012; Khosla, 2013). Além disso, outros fatores como a

variações sazonal e circadiana podem interferir nas concentrações dos MBO (Bjarnason et al., 2002; Arens et al, 2007).

A espécie *Chlorocebus aethiops*, é amplamente utilizada em estudos biomédicos, principalmente pela baixa susceptibilidade e resistência a doenças (Haus et al., 2013). No entanto, poucos relatos sobre MBO em primatas não humanos foram descritos na literatura (Crawford et al., 1997; Colman et al. 1999; Havill et al., 2006), com nenhuma citação na espécie *C. aethiops*. Portanto, o presente estudo propõe a avaliação do efeito da idade e do sexo nas concentrações dos marcadores ósseos propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), osteocalcina (OC),  $\beta$ -crosslaps ( $\beta$ -CTX) e paratormônio fração intacta (PTH) nessa espécie sob condições de cativeiro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESPÉCIE

Os indivíduos do gênero *Chlorocebus*, usualmente denominados macaco verde africano, são primatas do velho mundo (Catarrhini) amplamente distribuídos em habitats de savana na África sub-saariana (Kingdon, 1994). Segundo Tchitchek et al. (2012), esse gênero está inserido como membro da família Cercopithecidae, subfamília Cercopithecinae e dividido em quatro espécies, sendo *C. aethiops*, *C. pygerythrus*, *C. sabaeus* e *C. tantalus*.

O *C. aethiops* está entre os menos especializados dos macacos do velho mundo, com grande plasticidade ambiental, sendo observados desde o Senegal ao Sudão e a Etiópia, além de populações selvagens substanciais que vivem em várias ilhas da Índia Ocidental, incluindo São Cristóvão e Nevis (Whitney, 1995). Esses primatas de médio porte apresentam dieta onívora e são considerados quadrúpedes semiterrestre, com braços longos e pernas adaptadas para a velocidade (Bolter, 2011). Feng et al. (2012) relataram que animais jovens de *C. aethiops* com idade entre 8 e 11 anos correspondem em média a 30 anos de idade para os seres humanos, e animais com idade de 21 até 26 anos equivalem aos humanos com 70 anos de idade ou mais. A expectativa de vida em cativeiro chega a 31 anos (Hakeem et al., 1996).

Diversas pesquisas foram realizadas com o macaco verde africano, tais como estudos de imunologia (Tchitchek et al., 2012), neurociência (Jentsch et al., 1997), doença de Parkinson (Campos-Romo et al., 2009), doenças cardiovasculares (Cook et al., 1995), biologia celular (Almeida et al., 2011) e farmacologia (Thuita et al., 2013). Adicionalmente,

foram efetuados estudos com doenças infecciosas, principalmente virais, uma vez que esse primata é um dos 40 hospedeiros naturais do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) (Liovat et al., 2009).



**Figura 1:** Indivíduos da espécie *Chlorocebus aethiops*.  
Fonte: CENP, 2015.

## 2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ÓSSEO

A remodelação óssea é o processo de renovação e modificação constante da matriz óssea já formada. Há o processo de reabsorção óssea, em que o osso envelhecido é removido pelos osteoclastos; e o processo de formação óssea efetuado pelos osteoblastos, os quais fazem a deposição de nova matriz óssea (Riggs, 1991). No ciclo típico de remodelação, a reabsorção ocorre de sete a dez dias e a formação de dois a três meses, com taxas idênticas de formação e reabsorção para que haja correta fixação da massa óssea (Watts, 1999). Assim, vários fatores locais e sistêmicos regulam essa remodelação, incluindo forças elétricas, mecânicas, hormônios (PTH, hormônios da tireóide, vitamina D, estrógeno, andrógenos, cortisol, calcitonina e hormônio do crescimento), fatores do crescimento e citocinas (Watts, 1999).

Os MBO são produtos resultantes da remodelação óssea, e refletem o mecanismo fisiopatológico subjacente à perda óssea (Riggs, 1991). Esses biomarcadores estão divididos em três categorias: (I) enzimas ou proteínas; (II) produtos da quebra dos colágenos; e (III) produtos oriundos da síntese do novo osso. Dependendo da origem, os marcadores são

classificados como índices de formação ou reabsorção óssea (Watts, 1999; Cremers e Garnero, 2006).

Os marcadores de formação óssea incluem proteínas derivadas da síntese da matriz óssea, tais como a osteocalcina, fragmentos amino e carboxiterminais do pró-colágeno, ou uma enzima, fosfatase alcalina, lançada na circulação durante a síntese da matriz óssea. Por sua vez, os marcadores de reabsorção óssea são os produtos de degradação da matriz óssea (Watts, 1999; Cremers e Garnero, 2006). Uma vez que o processo de reabsorção é mais curto que o de formação, marcadores de reabsorção respondem mais rápido às mudanças que os de formação (Watts, 1999). No entanto, os dois tipos de marcadores identificam mudança antes da ocorrência de alterações na densidade mineral óssea, com diminuição acentuada dos valores de marcadores bioquímicos de remodelação óssea (Gertz et al., 1994; Civitelli et al., 2009).

### 2.2.1 Propeptídeo Aminoterminal do Pró-Colágeno Tipo I (PINP)

O PINP é um peptídeo utilizado como marcador de formação óssea, derivado de clivagem pós-tradução da molécula de procolágeno tipo I (Vargas et al., 1997). O colágeno tipo I corresponde a aproximadamente 90% da matriz óssea, sendo o principal produto de secreção do osteoblasto, célula responsável pela síntese da matriz óssea orgânica. Os 10% restantes são constituídas por proteínas não colágenas, como a osteocalcina, osteonectina, osteopontina e outras como alguns fatores de crescimento (Watts, 1999).

Os níveis séricos do PINP circula com duas extensões principais: C-(carboxi), que corresponde a forma intacta e autêntica no propeptídeo clivado in vivo, e o outro N-(amino), um peptídeo menor que se assemelha a parte aminoterminal e mais imunogênico do pro alfa-1 do PINP (Risteli et al., 1995). Estas extensões (propeptídeos) são removidas por proteases específicas durante a conversão do procolágeno em colágeno e subsequente incorporação na matriz óssea. A extensão medida por este ensaio é a aminoterminal, daí a designação PINP – propeptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I. Conseqüentemente, o PINP é um indicador específico da deposição do colágeno tipo I, por isso, definido como um verdadeiro marcador da formação do osso (Brandt et al., 2001).

O PINP é liberado durante a formação do colágeno de tipo I para o espaço intracelular e, eventualmente, para a corrente sanguínea. Acredita-se que esse marcador é liberado como

estrutura trimérica do colágeno, mas é rapidamente decomposto em forma monomérica pelos efeitos da degradação térmica (Brandt et al., 1999). O método por Imunoensaio para a determinação quantitativa é capaz de detectar as duas frações presentes no sangue (Garnero et al., 1999).

Além de ser recomendado como excelente marcador ósseo, o PINP possui várias vantagens, como a baixa variabilidade interindividual (Vasikaran et al., 2011). Desta forma, apresenta desempenho analítico adequado para a triagem da osteoporose (Delmas et al., 2000; Botella et al., 2013), doença de Paget (Shankar e Hosking, 2006) e tumor maligno (Saad et al., 2012). Além disso, esse marcador tem especial relevância na avaliação da função osteoblástica em pacientes com hipertireoidismo ou hipotireoidismo, uma vez que seu metabolismo não é influenciado pelos hormônios tireoidianos (Risteli et al., 1995).

### 2.2.2 Osteocalcina (OC)

É uma proteína de matriz óssea secretada por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos, diretamente estimulada pelos hormônios reguladores do cálcio (calcitonina, paratormônio e vitamina D3) (Price, 1987). A OC possui propriedade de ligação com cálcio mediada por dependentes de vitamina K e resíduos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) (Owen et al., 1990). Embora a maior parte da osteocalcina, seja incorporada na matriz óssea, responsável pela mineralização no tecido do osso, uma pequena porção é encaminhada a circulação sanguínea, sendo hidrolisada no fígado e rim por metaloproteases, tornando a vida plasmática curta (Delmas et al., 2000).

A OC pode ser identificada por métodos bioquímicos de análise, em diversas formas moleculares circulantes. Há a forma intacta, que contém um fragmento aminoterminal grande e fragmentos menores contendo frações de aminoácidos, cuja excreção é dependente da função renal, de modo que, valores acima do habitual podem ser encontrados quando a filtração pelos túbulos renais está comprometida (Delmas et al., 2000).

Esse biomarcador é uma das proteínas mais abundantes não colágenas na matriz óssea, excelente marcador de formação óssea (Seibel, 2006), podendo ser utilizado no diagnóstico da doença de Paget e do hiperparatireoidismo primário, bem como na avaliação do tratamento da osteoporose (Delmas et al., 2000) e em metástase óssea (Salem et al., 2007). No entanto, é

totalmente degradada quando sofre ação de enzimas osteoclásticas, não sendo útil como marcador bioquímico de reabsorção óssea (Seibel, 2006).

Uma série de fatores deve ser considerada para a interpretação dos níveis de osteocalcina, como o ritmo circadiano, uma vez que a maior reabsorção ocorre durante a noite. Em humanos atinge o pico às 4 horas e a menor às 17 horas, com uma diferença de aproximadamente 15% (Heshmati et al., 1998). Deve-se ainda considerar a variação biológica, alterações sazonais, ciclos menstruais, metodologia empregada e as condições de coleta, que podem interferir no resultado, uma vez que o peptídeo é susceptível a proteólise (Delmas et al., 2000; Seibel, 2006).

### 2.2.3 $\beta$ -crosslaps ( $\beta$ -CTX)

O  $\beta$ -CTX são fragmentos de colágeno de tipo I, chamados de telopeptídeos do terminal C de colágeno tipo I (CTX), gerado pela catepsina K, pequeno fragmento específico no biomarcador reconhecido pelo anticorpo. Bastante singular, esse marcador combina uma série de passos de processamento que ocorrem no colágeno de tipo I, sendo liberado na circulação sanguínea durante a reabsorção óssea e é quase inteiramente excretado pelos rins. Trata-se de marcador específico para a degradação de colágeno tipo I maduro, a partir de tecido ósseo (Peichl et al., 2001).

O CTX é considerado marcador de reabsorção óssea, que permite avaliar a atividade da reconstituição óssea, podendo ser dosado por duas formas: sem isomerização  $[\alpha]$ -CTX-I, a qual reflete a reabsorção de osso novo; com isomerização chamada  $[\beta]$ -CTX-I, uma reação lenta e espontânea relacionada ao envelhecimento das moléculas de proteínas, refletindo a reabsorção do osso velho. Essa relação entre  $[\alpha]$ -CTX-I e  $[\beta]$ -CTX-I apresenta características especiais em diferentes doenças, como por exemplo na de Paget (Garnero e Delmas, 1998).

Na reabsorção óssea elevada fisiológica ou patológica, o colágeno de tipo I é degradado em maior extensão, com aumento equivalente do nível de fragmentos de colágeno no sangue. Essa determinação dos telopeptídeos de terminal C no soro é recomendada no monitoramento da eficácia da terapêutica anti-reabsortiva, como bifosfatos ou terapêutica de substituição hormonal, na osteoporose, tumores malignos, metástases ósseas e em outras doenças ósseas (Rosenquist et al., 1998; Seibel, 1998; Coleman, 2002; Salem et al., 2007).

O  $\beta$ -CTX foi proposto como um marcador clinicamente mais útil de reabsorção do osso pela sensibilidade aprimorada e especificidade, tornando possível a determinação em soro sanguíneo (Okabe et al., 2001). O ensaio Elecsys  $\beta$ -CrossLaps/serum® foi desenvolvido especificamente para quantificar os fragmentos de colágeno de tipo I isomerizados com ligações cruzadas, por utilizar de dois anticorpos monoclonais (Rosenquist et al., 1998).

#### 2.2.4 Paratormônio (PTH)

O PTH é hormônio de constituição protéica, sintetizado pelas glândulas paratireóides localizadas na região anterior à tireóide. Esse hormônio é formado por uma cadeia polipeptídica com 84 aminoácidos em sua forma final (Gracitelli et al., 2002, Bracco et al., 2003), sendo a fração ativa a sequência 1-34 de aminoácidos (Bracco et al., 2003). Armazenado em vesículas de secreção, o PTH pode sofrer metabolização intracelular, fazendo com que apenas os fragmentos com terminação carboxi-terminais sejam liberados para a circulação juntamente com a forma ativa (Gracitelli et al., 2002).

Um dos principais reguladores do metabolismo ósseo, o PTH, junto com a vitamina D e a calcitonina, possuem receptores específicos para cálcio em sua membrana, fazendo com que haja equilíbrio inversamente proporcional entre o nível plasmático de cálcio e produção de PTH, na ausência de doenças (Carrillo-Lopez et al., 2009). Contudo, deficiências da função da glândula paratiróidea podem provocar hipercalcemia ou hipocalcemia, condicionado por uma alteração da secreção de PTH. O hipofuncionamento da glândula (hipoparatiroidismo) exige teste de sensibilidade elevada para detectar um nível de PTH que se encontre substancialmente abaixo do normal (Nussbaum e Potts, 1994). Já o hiperparatiroidismo resulta em aumento da secreção de PTH, geralmente por ocorrência de adenomas da glândula paratiróidea, como causa primária. No hiperparatiroidismo secundário, o nível de cálcio no sangue é baixo por outros transtornos patológicos, como a deficiência de vitamina D (Bergenfelz et al., 1991).

A forma ativa do PTH atua em diversas formas no organismo, exercendo diferentes estímulos em sítios distintos (Gracitelli et al., 2002). No tecido ósseo, o aumento do PTH sérico exerce efeitos benéficos, ocasionando uma combinação de formação óssea e reabsorção óssea com estimulação de células osteoblásticas e atividades osteoclásticas. O hormônio se

liga a células da linhagem de osteoblastos, com promoção de osteólise pelos osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea e mobilização do cálcio do esqueleto. Essas ações elevam o cálcio extracelular, que ao atingir níveis normais, elimina o estímulo para a liberação de PTH (Goltzman, 2008).

O teste de imunoensaio determina o PTH intacto no sangue, teste crítico e determinante no diagnóstico da hipercalcemia mediada por PTH, incluindo carcinoma de paratireóide (PCA) (Allen et al., 2013). No entanto, fatores como utilização de corticóides, contaminação por alumínio, estrogênio e algumas citocinas pró-inflamatórias interferem na sua dosagem (Carrillo-Lopez et al., 2009).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. E.; SEMRAD, A.; YANG, A.D.; MARTINEZ, S. R. Parathyroid carcinoma survival: improvements in the era of intact parathyroid hormone monitoring? **Rare tumors** 5(1): 44-48. 2013.

ALMEIDA, J.; HILL, C.; COLE, K. Authentication of african green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. **BMC Biotechnology** 11-102. 2011.

ARENS, D.; SIGRIST, I.; ALINI, M.; SCHAWALDER, P.; SCHNEIDER, E.; EGERMANN, M. Seasonal changes in bone metabolism in sheep. **The Veterinary Journal** 174:585–591. 2007.

BANFI, G.; LOMBARDI, G.; COLOMBINI, A.; LIPPI, G. Bone metabolism markers in sports medicine. **Sports Medicine** 40:697–714. 2010.

BELIC, M.; KUŠEC, V.; SVETINA, A.; GRIZELJ, J.; ROBIC, M.; VRBANAC, Z. The influence of sex on biochemical markers of bone turnover in dogs. **Research in Veterinary Science**. 93:918-920. 2012.

BERGENFELZ, A.; NORDÉN, N. E.; AHRÉN, B. Intraoperative fall in plasma levels of intact parathyroid hormone after removal of one enlarged parathyroid gland in hyperthyroid patients. **Eur J Surg** 157:109-112. 1991.

BJARNASON, N. H.; HENRIKSEN, E. G.; ALEXANDERSEN, P.; CHRISTGAU, S.; HENRIKSEN, B. D.; CHRISTIANSEN, C. Mechanism of circadian variation in bone resorption. **Bone** 30:307-313. 2002.

BOLTER, D. R. A comparative study of growth patterns in crested langurs and vervet monkeys. **Anatomy Research International** 1-12. 2011.

- BOTELLA, S.; RESTITUTO, P.; MONREAL, I.; COLINA, I.; CALLEJA, A.; VARO, N. Traditional and novel bone remodeling markers in premenopausal and postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 98(11): 1740-1748. 2013.
- BRACCO, O. L.; KAYATH, M. R. J.; VIEIRA, J. G. H. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 47:285-91. 2003.
- BRANDT, J.; FREDERIKSEN, J. K.; JENSEN, C. H.; TEISNER, B. The N- and C- terminal propeptides of human procollagen type 1 (PINP and PICP): molecular heterogeneity and assay technology. In: EASTELL R, BAUMANN, M.; HOYLE, N.R.; WIECZOREK, L. (Eds.) **Bone Markers Biochemical and Clinical perspectives**. p. 73-81. 2001.
- BRANDT, J.; KROGH, T. N.; JENSEN, C. H.; FREDERIKSEN, J. K.; TEISNER, B. Thermal instability of the trimeric structure of the N-terminal propeptide of human procollagen type 1 in relation to assay technology. **Clin Chem** 45(1):47-53. 1999.
- CAMPOS-ROMO, A.; OJEDA-FLORES, R.; MORENO-BRISEÑO, P.; FERNANDEZ, R. J. Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the Hallway task. **J. Neurosci. Methods** 177: 361-368. 2009.
- CARRILLO-LOPEZ, N.; FERNANDEZ-MARTIN, J.L.; CANNATA-ANDIA, J. B. The role of calcium, calcitriol and their receptors in parathyroid regulation. **Nefrologia** 29(2):103-8. 2009.
- CERRONI, A. M.; TOMLINSON, A.G.; TURNQUIST, J. E.; GRYNPAS, M. D. Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. **American Journal of Physical Anthropology** 113:389-410. 2000.
- CIVITELLI, R.; ARMAMENTO-VILLAREAL, R.; NAPOLI, N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. **Osteoporos Int** 20:843–851. 2009.
- COLEMAN, R. E. The Clinical Use of Bone Resorption Markers in Patients with Malignant Bone Disease. **American Cancer Society** 94(10): 2521-2133. 2002.
- COLMAN, J. R.; LANE, M. A.; BINKLEY, N.; WEGNER, F. H.; KEMNITZ, J. W. Skeletal effects of aging in male rhesus monkeys. **Elsevier Science** 24:17–23. 1999.
- COOK, J. J.; SITKO, G. R.; BEDNAR, B.; CONDRA, C.; MELLOTT, M. J.; FENG, D. M.; NUTT, R. F.; SHAFER, J. A.; GOULD, R. J.; CONNOLLY, T. M. An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the african green monkey. **Circulation** 91(12):2961-2971. 1995.
- CRAWFORD, B. A.; HAREWOOD, W. J.; HANDELSMAN, D. J. Growth and hormone characteristics of pubertal development in the hamadryas baboon. **J Med Primatol** 26:153-163. 1997.
- CREMERS, S.; GARNERO, P. Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease: potential uses and pitfalls. **Drugs** 66:2031-2058. 2006.

- DELMAS, P. D.; EASTELL, R.; GARNERO, P.; SEIBEL, M. J.; STEPAN, J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. **Osteoporos Int Suppl** 16:12-17. 2000.
- DUNCAN, A. E.; COLMAN, R. J.; KRAMER, P. A. Sex differences in spinal osteoarthritis in humans and rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Spine** 37:915–922. 2012.
- FENG, X.; ZHANG, T.; XU, Z.; CHOI, S. J.; QIAN, J.; FURDUI, C. M.; REGISTER, T. C.; DELBONO, O. Myosin heavy chain isoform expression in the vastus lateralis muscle of aging african green vervet monkeys. **Exp Gerontol** 47(8): 601–607. 2012.
- GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover - Applications for Osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin N Am** 27:303-23. 1998.
- GARNERO, P.; SORNAY-RENDU, E.; DUBOEUF, F.; DELMAS, P.D. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over four years: The OFELY study. **J Bone Miner Res** 14:1614-1621. 1999
- GERTZ, B. J.; SHAO, P.; HANSON, D. A.; QUAN, H.; HARRIS, S. T.; GENANT, H. K.; CHESNUT, C. H.; EYRE, D. R. Monitoring bone resorption in early postmenopausal women by an immunoassay for crosslinked collagen peptides in urine. **J Bone Miner Res** 9:135-142. 1994.
- GOLTZMAN, D. Studies on the mechanisms of the skeletal anabolic action of endogenous and exogenous parathyroid hormone. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 473: 218-224. 2008.
- GRACITELLI, M. E. C.; VIDORIS, A. A. C.; LUBA, R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Paratormônio e osteoporose: encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 46:215-20. 2002.
- HAKEEM, A.; SANDOVAL, G. R.; JONES, M.; ALLMAN, J. Brain and life span in primates. In: BIRREN J.E.; SCHAIE, K.W. (Eds.). **Handbook of the psy-chology of aging**. Academic Press. p. 78–104. 1996.
- HAUS, T.; AKOM, E.; AGWANDA, B.; HOFREITER, M.; ROOS, C.; ZINNER, D. Mitochondrial diversity and distribution of african green monkeys (*Chlorocebus Gray, 1870*). **American Journal of Primatology** 75:350-360. 2013.
- HAVILL, L. M.; HALE, L. G.; NEWMAN, D. E.; WITTE, S. M.; MAHANEY, M. C. Bone ALP and OC reference standards in adult baboons (*Papio hamadryas*) by sex and age. **J Med Primatol** 35:97-105. 2006.
- HERNÁNDEZ-GODÍNEZ, B.; CONTRERAS, A. I.; CASTANEDA, G. P.; GALVÁN-MONTAÑO, A.; MONTES DE OCA, G. G.; VALDEZ, C. Z.; BETANCOURT, E. T. Radiographic incidence of spinal osteopathologies in captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **American Association for Laboratory Animal Science** 60:396-399. 2010.
- HESHMATI, H. M.; RIGGS, B. L.; BURRITT, M. F.; MCALISTER, C. A.; WOLLAN, P. C.; KHOSLA, S. Effects of the circadian variation in serum cortisol on markers of bone

turnover and calcium homeostasis in normal postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metabol** 83:751-7. 1998.

JENTSCH, J. D.; REDMOND, D. E.; ELSWORTH, J. D.; TAYLOR, J. R.; YOUNGREN, K. D.; ROTH, R. H. Enduring cognitive deficits and cortical dopamine dysfunction in monkeys after long- term administration of phencyclidine. **Science** 277(5328): 953–955. 1997.

KHOSLA, S. Pathogenesis of age-related bone loss in humans. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 68:1226–1235. 2013.

KINGDON, J. East African mammals: An atlas of evolution in Africa. Chicago: **University of Chicago Press** 1:212. 1994.

LIOVAT, A.S.; JACQUELIN, B.; PLOQUIN, M.J.; BARRE-SINOUSSE, F.; MULLER-TRUTWIN, M.C. African non-human primates infected by SIV - why don't they getsick? Lessons from studies on the early phase of non-pathogenic SIV infection. **Current HIV Research** 7:39–50. 2009.

NUSSBAUM, S.; POTTS, J. T. Advances in Immunoassays for Parathyroid Hormone. Clinical Applications to Skeletal Disorders of Bone and Mineral Metabolism. In: BILEZIKIAN, J.P.; LEVINE, M.A.; MARCUS, R. (Eds.). **The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts**. Raven Press, New York. 157-169. 1994.

OKABE, R.; NAKATSUKA, K.; INABA, M.; MIKI, T.; NAKA, H.; MASAKI, H.; MORIGUCHI, A.; NISHIZAWA, Y. Clinical Evaluation of the Elecsys  $\beta$ -CrossLaps Serum Assay, a New Assay for Degradation Products of Type I Collagen C-Telopeptides. **Clinical Chemistry** 47(8):1410–1414. 2001.

OWEN, T. A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M. S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J Cell Physiol** 143:420-30. 1990.

PEICHL, P.; GRIESMACHERB, A.; MARTEAU, R.; HEJC, S.; KUMPAN, W.; MÜLLER, M. M.; BRÖLL, H. Serum crosslaps in comparison to serum osteocalcin and urinary bone resorption markers. **Clinical Biochemistry** 34: 131–139. 2001.

PRICE, C. P. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. **Ann Clin Biochem** 30:355-372. 1993.

PRICE, P. A. Vitamin K-dependent proteins. In: COHN, D.V. (Ed.). **Calcium regulation and bone metabolism basic and clinical aspects**. Amsterdam, Elsevier Science. p.419–425. 1987.

REINWALD, S.; BURR, D. Review of Nonprimate, Large animal models for osteoporosis research. **Journal of Bone and Mineral Research** 23(9):1353-1368. 2008.

RIGGS, B. L. Overview of osteoporosis. **West J Med** 154:63-77. 1991.

RISTELI, J.; NIEMIL, S.; KAUPPILA, S.; MELKKO, J.; RISTELI, L. Collagen propeptides as indicators of collagen assembly. **Acta Orfhop Scand** 66:183-188. 1995.

ROSENQUIST, C.; FLEDELIUS, C.; CHRISTGAU, S.; PEDERSEN, B.J.; BONDE, M.; QVIST, P.; CHRISTIANSEN, C. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. **Clin Chem** 44(11):2281-2289. 1998.

SAAD, F.; EASTHAM, J. A.; SMITH, M. R. Biochemical markers of bone turnover and clinical outcomes in men with prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations** 30:369–378. 2012.

SALEM, A. M.; ZOHNY, S. F.; EL-WAHAB, M. M. A.; HAMDY, R. Predictive value of osteocalcin and  $\beta$ -CTX in metastatic breast cancer. **Clinical Biochemistry** 40:1201-1208. 2007.

SEIBEL M.J. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels: Klinische Wertigkeit in der Praxis. **Ther Umsch** 55(11):676-684. 1998.

SEIBEL, M. J. Biochemical markers of bone turnover part II: clinical applications in the management of osteoporosis. **Clin Biochem Rev** 27:123–138. 2006.

SHANKAR, S.; HOSKING, D. J. Biochemical assessment of Paget's disease of bone. **J Bone Miner Res** 21(2):22-27. 2006.

SOUBERBIELLE, J. C.; MARQUE, D.; BONNET, P.; HERVIAUX, P.; SACHS, C. Simple method to evaluate specificity of osteocalcin immunoassays. **Clinica Chemica** 43:1663-1665. 1997.

TCHITCHEK, N.; JACQUELIN, B.; WINCKER, P.; DOSSAT, C.; SILVA, C.; WEISSENBACH, J.; BLANCHER, A.; MULLER-TRUTWIN, M.; BENECKE, A. Expression sequence tag library derived from peripheral blood mononuclear cells of the *Chlorocebus sabaeus*. **BMC Genomics** 13:279. 2012.

THUITA, J. K.; WOLF, K. K.; MURILLA, G. A.; LIU, Q.; MUTUKU, J. N.; CHEN, Y.; BRIDGES, A. S.; MDACHI, R. E.; ISMAIL, M. A.; CHING, S.; BOYKIN, D. W.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R.; PAINE, M. F.; BRUN, R.; WANG, M. Z. Safety, Pharmacokinetic, and efficacy studies of oral DB868 in a first stage vervet monkey model of human African trypanosomiasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 7 (6):1-13. 2013.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. 8ªed. Porto Alegre: Artmed. 712p. 2012.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev Ass Med Brasil** 43(4): 367-370. 1997.

VASIKARAN, S.; EASTELL, R.; BRUYÈRE, O.; FOLDES, A. J.; GARNERO, P.; GRIESMACHER, A.; MCCLUNG, M.; MORRIS, H. A.; SILVERMAN, S.; TRENTI, T.; WAHL, D. A.; COOPER, C.; KANIS, J. A. for the IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group: Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring

of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. **Osteoporos Int** 22:391–420. 2011.

VIEIRA, J. G. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arq Bras Endocrinol Metab** 43(6): 415-422. 1999.

WATTS, N. B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clin Chem** 45:1359-1368. 1999.

WHEATER ,G.; ELSHAHALY, M.; TUCK, S. P.; DATTA, H. K.; LAAR, J. M. V. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. **Journal of Translational Medicine** 11:201. 2013.

WHITNEY, R.A. Taxonomy in nonhuman primates. In: BENNETT, B.T.; ABEE, C.R.; HENRICKSON, R. (Eds.). Nonhuman primates in biomedical research, Biology and Management. **Academic Press**. p.33-47.1995.

Artigo apresentado conforme normas do periódico “Journal of Medical Primatology”

**Efeito da idade e sexo nos marcadores ósseos em *Chlorocebus aethiops* mantidos em cativeiro**

**Marcadores ósseos em *Chlorocebus aethiops***

Aline Amaral Imbeloni<sup>1,2</sup>, Sheila Canevese Rahal<sup>3</sup>, Ednaldo da Silva Filho<sup>2</sup>, Bianca Mendonça Faria<sup>2</sup>, Wellington Bandeira da Silva<sup>1,2</sup>, Mika Ester Aihara<sup>1</sup>, Frederico Ozanan Barros Monteiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Primatas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Ananindeua, PA, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação de Saúde e Produção Animal da Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Cirurgia Veterinária e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

**Correspondência:**

Professor Frederico Ozanan Barros Monteiro. Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) / Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA). Avenida Presidente Tancredo Neves, Nº 2501. Bairro: Terra Firme Cep: 66.077-901. Belém-Pará-Brazil. Phone: +55 91 32105261, Fax +55 91 32105256

## Resumo

**Introdução** Objetivou-se avaliar o propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), osteocalcina (OC),  $\beta$ -crossLaps ( $\beta$ -CTX) e paratormônio (PTH) em relação ao sexo e idade, de *Chlorocebus aethiops* em cativeiro.

**Material e métodos** Setenta e três símios foram divididos em quatro faixas etárias: FE 1 - infante-juvenil; FE 2 – adulto jovem; FE 3 - adulto e FE 4 - senil. Utilizou-se o soro sanguíneo para determinação dos marcadores ósseos pela técnica de eletroquoluminescência no analisador Elecsys 2010.

**Resultados e conclusões** O sexo não influenciou nos resultados dos biomarcadores. No entanto, os parâmetros de OC, PINP,  $\beta$ -CTX, apresentaram correlação negativa com a idade (FE1> FE2, FE3 e FE4). O PTH apresentou correlação foi positiva com a idade, sendo FE4>FE1, FE2, FE3. Os dados obtidos podem ser utilizados como intervalos de referência de biomarcadores do metabolismo ósseo, a partir de *C. aethiops* saudáveis em cativeiro.

**Palavras-chave:** primatas, marcadores de formação óssea, marcadores de reabsorção óssea.

## Introdução

Como membros de habitats biologicamente diversos, as populações de primatas não humanos (PNH) agem como sentinelas para a investigação de patógenos e modelos para a pesquisa básica sobre a dinâmica da transmissão natural de doenças. Nesse contexto, os PNH criados em cativeiro têm sido úteis para gerar informações sobre doenças emergentes (AIDS, Ebola, hantavírus e dengue). Além disso, estudos com esses animais podem beneficiar os esforços de conservação, preenchendo lacunas entre o conhecimento de laboratório e a necessidade de investigações epidemiológicas [43].

A espécie *Chlorocebus aethiops*, pertence à família Cercopithecidae, sendo endêmica da savana africana sub-saariana [28]. Também conhecido como macaco verde africano, esse primata é amplamente utilizado em estudos biomédicos, principalmente devido a baixa susceptibilidade e resistência a doenças [22]. Essa espécie tem sido usada como modelo para estudos do HIV (Human immunodeficiency virus) [30], doença de Parkinson [8], doenças cardiovasculares [12], e pesquisas relacionadas à farmacologia [40], imunologia [37] e biologia celular [1].

Inúmeras doenças ósseas metabólicas acometem os primatas não humanos do velho mundo, principalmente relacionadas com o avanço da idade [9, 24]. O envelhecimento é um processo de deterioração do organismo, que inclui aumento da susceptibilidade a doenças, mudanças adversas na fisiologia, com perda de mobilidade e agilidade [19]. Na maioria das vezes as modificações ósseas representam o envelhecimento físico, como nas osteoartrites [15], osteopenia [9], osteófitos, espondiloses [24] e, principalmente, na osteoporose [9, 24], todos já relatadas em primatas.

Para diagnóstico dessas doenças, além da avaliação clínica e técnicas de imagens, os marcadores ósseos desempenham importante papel na caracterização dos componentes intracelulares e extracelulares da matriz óssea [34]. Eles revelam o mecanismo fisiopatológico subjacente à perda óssea, os quais refletem tanto a formação como a reabsorção óssea, processo denominado remodelação óssea [32].

Marcadores ósseos séricos são úteis para identificar com maior sensibilidade distúrbios metabólicos, auxiliando no diagnóstico precoce de doenças, prevenido assim o risco de perda óssea grave e subseqüentes fraturas [10]. Além disso, contribuem para a decisão terapêutica e avaliação da eficácia do tratamento [10, 33]. Contudo, a principal deficiência na utilização desses biomarcadores é a variabilidade biológica, que é afetada por

fatores como: idade, sexo, nutrição, atividade física e doenças sistêmicas [3, 5, 23, 27, 35, 41]. Além de outros fatores relacionados as variações sazonais e circadianas [2, 6].

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os marcadores bioquímicos ósseos (MBO), determinando padrões de medição de referência ainda não relatados em *C. aethiops*. A hipótese foi que em condições padronizadas de cativeiro, a idade e o sexo podem influenciar nesses parâmetros.

## **Material e Métodos**

### Animais e condições de manejo

Este estudo adotou as todas as orientações contidas nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência e Tecnologia (CONCEA-MCT) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Evandro Chagas (N° 0014/2014- CEUA-IEC).

Foram utilizados 73 *Chlorocebus aethiops*, sendo 36 machos e 37 fêmeas, mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP - Ananindeua, Pará, Brasil, latitude 1°38'26" e longitude 48°38'22"). Os indivíduos foram distribuídos em quatro faixas etárias (FE), conforme estabelecido pelo CENP: FE 1 [infanto-juvenil - 1 a 3 anos (7 machos e 8 fêmeas)]; FE 2 [adulto jovem - 6 a 9 anos (14 machos e 8 fêmeas)]; FE 3 [adulto - 10 a 15 anos (5 machos e 13 fêmeas)]; FE 4 [senil - 20 a 25 anos (10 machos e 8 fêmeas)]. Todos os animais possuíam combinação única de três letras tatuadas na região peitoral e "microchips" implantados na porção dorsal da região interescapular para identificação e controle. Para possibilitar a comparação com estudos em humanos, foi utilizado uma proporção descrita por Feng et al. (16), na qual um ano em *C. aethiops* equivale a três anos em humanos.

Os animais estavam alojados no setor de reprodução da espécie e eram mantidos em recintos coletivos (média de sete indivíduos por grupo) construídos em alvenaria e tela de arame (3m x 3m x 3m), com piso cerâmico, e comedouros e plataformas suspensas. Este setor foi projetado na direção norte-sul, a fim de receber até 12 h de luz natural, permitindo o acesso regular à radiação solar ao longo do ano. O clima na região foi classificado como úmido, mesotérmico, com chuvas regulares de janeiro a junho e os índices pluviométricos de 242 mm. A temperatura média foi de 27°C (máx. 32°C e min. 22°C), com umidade relativa do ar em torno de 82% [25]. Os recintos possuíam dupla comunicação lateral controlada por porta tipo corrediça, utilizada para manejo do grupo. Os cuidados diários incluíam limpeza diária dos recintos e alimentação oferecida duas vezes ao dia, sendo de manhã ração peletizada específica para primatas (Megazoo® P18, Proteína 18%, Fibra Máx. 6,5%, Betim – MG, Brasil) e a tarde hortifrutigranjeiros e água ad libitum.

Para a seleção dos animais foi realizado hemograma (Cell-Dyn Ruby Hematology System, Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A) e bioquímica sérica, nos parâmetros fosfatase alcalina, proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama glutamil transferase (GGT), creatinina e ureia (C4000® Abbott Diagnostics, Illinois, U.S.A, Brasil), utilizando critérios de exclusão a presença de leucocitose, anemias, problemas hepáticos e/ou renais. Foi realizado ainda, exame radiográfico nas posições ventrodorsal, lateral direita e lateral esquerda incluindo a coluna cervical, torácica, lombar e sacral (Intercal Cr-7, 100mAs, 90Kv), excluindo símios com osteopenia e histórico de fraturas, além de excluir animais que estavam utilizando corticoides, gestantes e em lactação.

#### Contenção e exame hematológico

Para realização dos exames de sangue, os símios foram submetidos a jejum prévio de oito horas. Foram contidos fisicamente por meio de puçá e sedados, utilizando-se a associação

anestésica de cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoletil<sup>®</sup> 50, Virbac, Brasil), na dose de 4 mg/kg/IM [24] e, posteriormente, pesados na balança digital (Indústrias Filiziola S/A. Rua Joaquim Carlos, 1236, São Paulo, SP, Brasil).

Foram coletados 2 ml de sangue da veia femoral e acondicionados em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro, que foram centrifugados e mantidos em temperatura de - 80°C até o processamento das amostras. O propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), a N-MID osteocalcina (OC), o  $\beta$ -crossLaps ( $\beta$ -CTX) e o paratormônio fração intacta (PTH), foram dosados após descongelamento total do soro, utilizando uma alíquota de 20  $\mu$ L para o PINP e OC, e 50  $\mu$ L para o  $\beta$ -CTX e o PTH. Para leitura dos dados foi realizada a técnica de imunensaio electroquimioluminescente, com reagentes, calibradores e soro controle específico do analisador automatizado Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). De acordo com o fabricante o intervalo de medição dos marcadores ósseos são: PINP (5 - 1.200 ng/ml), OC (0,500 - 300 ng/ml);  $\beta$ -CTX (0,010 - 6,00 ng/ml) e PTH (1,20 - 5.000 pg/ml). Nos casos em que a concentração do analíto foi superior ao intervalo de medição do equipamento foi procedida a diluição na proporção de 1:1.

#### Análise estatística

Foram calculados os parâmetros de estatística descritiva (média e desvio padrão) para todas as variáveis. Os resultados dos marcadores ósseos e massa corporal foram testados para distribuição normal (Gaussiana) pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliar a diferença entre a massa corporal de machos e fêmeas foi utilizado o teste T-student. Utilizou-se o teste de Tukey (dados paramétricos) e o teste de Kruskal-wallis com comparação de Dunn (dados não paramétricos) para comparar a distinção entre sexo e idade sobre as variáveis. Foi realizada correlação de Pearson (r) para avaliar a relação entre os marcadores ósseos (PINP,

OC,  $\beta$ -CTX e PTH) e a idade dos animais. O programa utilizado foi o Estatística R com nível de significância de 5%.

## Resultados

O intervalos de referência das concentrações de marcadores ósseos estão descritos na Tabela 1. As variáveis OC e PINP tiveram distribuição não-gaussiana, enquanto que o  $\beta$ -CTX e PTH apresentaram distribuição de Gauss. A média da massa corporal não diferiu significativamente entre sexo na FE 1 ( $P = 0.997$ ), mas mostrou diferença na FE 2 ( $P = 0.0001$ ), FE 3 ( $P = 0.005$ ) e FE 4 ( $P = 0.0001$ ), com machos maiores que as fêmeas. Verificou-se que valores médios de OC, PINP,  $\beta$ -CTX e PTH não diferiram significativamente entre machos e fêmeas nas quatro faixas etárias ( $P > 0.05$ ). Contudo, os marcadores ósseos mostraram diferença significativa entre as faixas etárias ( $P < 0.05$ ). Nas variáveis PINP, OC e  $\beta$ -CTX essa diferença foi encontrada somente na FE 1 ( $P = 0.0001$ ), com as maiores concentrações desses marcadores, enquanto o PTH diferiu-se na FE 1 ( $P = 0.0001$ ) com menores médias e FE 4 ( $P = 0.0001$ ) com maiores médias (Tabela 2).

Observou-se correlação significativa entre os marcadores ósseos com a idade, sendo negativa para as variáveis de PINP ( $r = -0.643$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2A), OC ( $r = -0.711$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2B) e  $\beta$ -CTX ( $r = -0.488$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2C) e positiva para o PTH ( $r = 0.418$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 2D).

## Discussão

Alguns marcadores ósseos, tais como OC, fosfatase alcalina específica do osso (ALP), PTH, e telopéptido do terminal carboxilo de colagénio de tipo I (ICTP) foram descritos em primatas do Velho Mundo (babuínos - *Papio hamadryas* e rhesus - *Macaca mulatta*) [11, 13, 23], em humanos [4, 14, 20], e em cães [5]. No entanto, poucos estudos estabelecem

correlações diretas entre os intervalos de referência, em diferentes grupos etários e o sexo. Este é o primeiro estudo para avaliar o efeito da idade e do gênero nos quatro principais marcadores ósseos (PINP, OC,  $\beta$ -CTX, PTH) de *C. aethiops*. Este estudo contribui para a compreensão do metabolismo ósseo e estabelece valores de referência que podem ser úteis para a avaliação clínica desta espécie.

No presente estudo, o gênero não influenciou nos marcadores avaliados. No entanto, nos seres humanos, homens entre 20-49 anos apresentaram maiores concentrações de OC do que as mulheres, e em pessoas com mais de 50 anos, essas concentrações foram maiores no sexo feminino [20]. Em babuínos com idades entre 4-16 anos, os machos apresentaram concentrações de OC significativamente maiores do que as fêmeas. No entanto, em indivíduos com mais de 16 anos não houve diferença entre os sexos [23], em concordância com este estudo.

Em cães, observou-se influência do gênero em relação aos marcadores ósseos (OC e  $\beta$ -CTX), isso foi explicado pelo fato dos machos possuírem esqueleto mais robusto que as fêmeas, especialmente durante o crescimento e puberdade, quando os ganhos no tamanho e volume são maiores [5]. Estudos em humanos relataram que o esqueleto sofre influência dos esteróides sexuais, alterando a densidade óssea mineral e, conseqüentemente, as concentrações dos marcadores ósseos [18, 26]. Segundo Yilmaz et al. [44] a densidade mineral do esqueleto é influenciada pelos hormônios sexuais masculinos, que aumentam a secreção do hormônio de crescimento, favorecendo a proliferação de osteoblastos, responsáveis pela formação óssea. Os níveis de hormônios sexuais e a densidade óssea não foram avaliados neste estudo e não foi possível confirmar essa hipótese. No entanto, observou-se que animais pré-púberes (FE 1) não apresentaram diferença estatística na massa corporal de machos e fêmeas. Porém, em animais púberes (FE 2, FE 3 e FE 4) os machos

foram significativamente mais pesados que as fêmeas. Entretanto, a massa corporal de machos e fêmeas não influenciou nas concentrações dos marcadores ósseos.

O tecido ósseo possui alta atividade metabólica na infância e adolescência, sendo a formação óssea o principal processo que resulta em ganho ósseo, com aumento na reabsorção do osso. Sendo assim, o organismo jovem acumula mais de 35% desse tecido durante a fase de crescimento [42]. Isso pode explicar o aumento significativo dos marcadores PINP, OC e  $\beta$ -CTX na FE 1 em relação as demais faixas etárias. Esse aumento, provavelmente está relacionado com o acelerado crescimento do esqueleto nessa fase [5, 21].

No presente estudo observou-se declínio em relação à idade nas concentrações de marcadores de formação (PINP e OC) e reabsorção óssea ( $\beta$ -CTX). Esses resultados foram semelhantes a estudos desenvolvidos em humanos, nos quais foram mensuradas as concentrações de PINP [4, 29] e  $\beta$ -CTX [29, 36] e de OC em macaco rhesus [7, 11]. Essas alterações dos marcadores relacionadas à idade, provavelmente foram observadas em virtude da evolução fisiológica entre o final do processo de crescimento e a remodelação óssea que ocorre com o desenvolvimento do indivíduo adulto [21, 26, 32]. Uma vez que, em humanos, a remodelação ocorre em taxas menores em adultos do que jovens, em torno de 2 a 10% por ano da massa esquelética, equilibrado pela formação (osteoblastos) e reabsorção óssea (osteoclastos) [29, 31, 32].

À medida que a idade aumenta as concentrações de de PINP, OC e  $\beta$ -CTX diminuem em *C. aethiops*. Na fase de envelhecimento a ação dos osteoblastos é diminuída [20], pode ocorrer desequilíbrio na remodelação, com elevação da reabsorção sobre a formação óssea, o que ocasiona aumento na perda de massa óssea e, por conseguinte, risco de osteoporose [14]. Além disso, a perda óssea relacionada à idade pode está associada a deficiência de estrogênio

em homens e mulheres [26], diminuindo assim os níveis de marcadores bioquímicos de remodelação óssea [14].

O PTH foi o único marcador que mostrou correlação positiva com a idade, ou seja, as concentrações na FE 4 foram significativamente superiores às dos indivíduos da FE 1, corroborando com estudos realizados em humanos [26]. A absorção de cálcio no organismo é reduzida principalmente a partir de 60 anos de idade em humanos ocasionada pela redução da síntese da vitamina D [17]. Assim, durante o processo de envelhecimento os níveis de cálcio diminuem, aumentando a secreção do PTH. Isso promove a intensificação da reabsorção óssea e diminuindo a massa óssea relacionada a idade [41]. Esses autores afirmaram que a redução de cálcio está relacionada, principalmente, com sua baixa ingestão, uma vez que mulheres senis, suplementadas com cálcio, apresentaram níveis de PTH tão baixos quanto mulheres mais jovens. As concentrações de PTH encontradas em *C. aethiops* na FE 2, FE 3 e FE 4, foram superiores ao valor máximo recomendado pelo kit para indivíduos humanos (intervalo de referência 15 – 65 pg/ml) [39]. Em primatas neotropicais (*Callithrix penicillata*), sob condições de cativeiro semelhantes ao nosso estudo, observou-se que indivíduos submetidos a reduzida incidência de raios solares apresentaram menores níveis de 25-Hidroxi-vitamina D [38].

Em conclusão, a redução dos níveis de PINP, OC e  $\beta$ -CTX e o aumento do PTH estão relacionados com a idade, porém o sexo não influencia nesses parâmetros. A utilização da técnica de imunoenensaio de eletroquioluminescência para a leitura desses biomarcadores em *C. aethiops* foi eficiente utilizando os kits para humanos. Sendo assim, os valores obtidos podem ser utilizados como intervalos de referência para os biomarcadores de metabolismo ósseo em primatas saudáveis. No entanto, são necessários outros estudos para avaliar a aplicação clínica desses biomarcadores em casos de alterações ósseas metabólicas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro Nacional de Primatas (CENP), a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Editais Procad NF/2009; Procad/Casadinho 06/2011; Chamada Universal – MCTI/CNPq N° 14/2012, Faixa A).

## Referências

1. Almeida J, Hill C, Cole K: Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnol* 2011; **11**:102.
2. Arens D, Sigrist I, Alini M, Schawalder P, Schneider E, Egermann M: Seasonal changes in bone metabolism in sheep. *Vet J* 2007; **174**:585–591.
3. Banfi G, Lombardi G, Colombini A, Lippi G: Bone metabolism markers in sports medicine. *Sports Med* 2010; **40**:697–714.
4. Bayer M: Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0–18 years. *Osteoporos Int* 2014; **25**:729–736.
5. Belic M, Kušec V, Svetina A, Grizelj J, Robic M, Vrbanac Z: The influence of sex on biochemical markers of bone turnover in dogs. *Res Vet Sci* 2012; **93**:918-920.
6. Bjarnason NH, Henriksen EG, Alexandersen P, Christgau S, Henriksen BD, Christiansen C: Mechanism of circadian variation in bone resorption. *Bone* 2002; **30**:307-313.
7. Black A, Tilmont M, Handy AM, Scott WW, Shapse SA, Ingram DK, Roth GS, Lane MA: A Nonhuman Primate Model of Age-Related Bone Loss: A Longitudinal Study in Male and Premenopausal Female Rhesus Monkeys. *Bone* 2001; **28**:295–302.

8. Campos-Romo A, Ojeda-Flores R, Moreno-Briseño P, Fernandez-Ruiz J: Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the Hallway task. *J Neurosci Methods* 2009; **177**: 361-368.
9. Cerroni AM, Tomlinson AG, Turnquist JE, Grynopas MD: Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. *Am J Phys Anthropol* 2000; **113**:389-410.
10. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N: Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int* 2009; **20**:843–851.
11. Colman RJ, Lane MA, Binkley N, Wegner FH, Kemnitz JW: Skeletal effects of aging in male rhesus monkeys. *Bone* 1999; **24**:17-23.
12. Cook JJ, Sitko GR, Bednar B, Condra C, Mellott MJ, Feng DM, Nutt RF, Shafer JA, Gould RJ, Connolly TM: An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the african green monkey. *Circulation* 1995; **91**:2961-2971.
13. Crawford BA, Harewood WJ, Handelsman DJ: Growth and hormone characteristics of pubertal development in the hamadryas baboon. *J Med Primatol* 1997; **26**:153-163.
14. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J: The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000; **6**:2-17.
15. Duncan AE, Colman RJ, Kramer PA: Sex differences in spinal osteoarthritis in humans and rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Spine* 2012; **37**:915–922.
16. Feng, X, Zhang T, Xu Z, Choi SJ, Qian J, Furdui CM, Register TC, Delbono O: Myosin heavy chain isoform expression in the Vastus Lateralis muscle of aging african green vervet monkeys. *Exp Gerontol* 2012; **47**:601–607.
17. Frank AA, Soares EA: *Nutrição no Envelhecer*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

18. Gertz BJ, Shao P, Hanson DA, Quan H, Harris ST, Genant HK, Chesnut CH, Eyre DR: Monitoring bone resorption in early postmenopausal women by an immunoassay for crosslinked collagen peptides in urine. *J Bone Miner Res* 1994; **9**:135-142.
19. Goldsmith TC: *The evolution of aging: How New Theories Will Change the Future of Medicine*, 3ed. Crownsville: Azinet Press, 2014.
20. Gundberg CM, Looker AC, Nieman SD, Calvo MS: Patterns of osteocalcin and bone specific alkaline phosphatase by age, gender, and race or ethnicity. *Bone* 2002; **31**:703-708.
21. Hannon R, Eastell R: Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000; **6**:30-44.
22. Haus T, Akom E, Agwanda B, Hofreiter M, Roos C, Zinner D: Mitochondrial diversity and distribution of african green monkeys (*Chlorocebus* Gray, 1870). *Am J Primatol* 2013; **75**:350-360.
23. Havill LM, Hale LG, Newman DE, Witte SM, Mahaney MC: Bone ALP and OC reference standards in adult baboons (*Papio hamadryas*) by sex and age. *J Med Primatol* 2006; **35**:97-105.
24. Hernández-Godínez B, Contreras AI, Castaneda GP, Galván-Montañó A, Montes de Oca GG, Valdez CZ, Betancourt ET: Radiographic Incidence of Spinal Osteopathologies in Captive Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010; **60**:396-399.
25. INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). [www.inmet.go.br](http://www.inmet.go.br). Acessado em 29.11.2014.
26. Khosla S, Melton LJ, III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG, Riggs BL: Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men

- and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**:2266-2274.
27. Khosla S: Pathogenesis of age-related bone loss in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; **68**:1226–1235.
  28. Kingdon J: East African mammals: An atlas of evolution in Africa. Chicago: University of Chicago Press, 1994.
  29. Kyvernitakis I, Saeger U, Ziller V, Bauer T, Seker-Pektas B, Hadji P: The effect of age, sex hormones, and bone turnover markers on calcaneal quantitative ultrasonometry in healthy german men. *J Clin Densitom: Assessment & Management of Musculoskeletal Health* 2013; **16**:320-328.
  30. Liovat AS, Jacquelin B, Ploquin MJ, Barre-Sinoussi F, Muller-Trutwin MC: African non-human primates infected by SIV - why don't they getsick? Lessons from studies on the early phase of non-pathogenic SIV infection. *Curr HIV Res* 2009; **7**:39-50.
  31. Pagni F, Francucci CM, Moro L: Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* 2005; **28**:8-13.
  32. Riggs BL: Overview of osteoporosis. *West J Med* 1991; **154**:63-77.
  33. Saraiva GL, Castro ML: Marcadores Coloidal: Marcadores bioquímico de remodelação ósseo. *Arq Bras Endocrinol metab* 2002; **46**:72-78.
  34. Seibel MJ: Clinical Application of Biochemical Markers of Bone Turnover. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; **50**:603-620.
  35. Souberbielle JC, Marque D, Bonnet P, Herviaux P, Sachs C: Simple method to evaluate specificity of osteocalcin immunoassays. *Clin Chem* 1997; **43**:1663-1665.
  36. Szulc P, Garnero P, Munoz F, Marchand F, Delmas PD. Cross-sectional evaluation of bone metabolism in men. *J Bone Miner Res* 2001; **16**:1642-1650.

37. Tchitchek N, Jacquelin B, Wincker P, Dossat C, Silva C, Weissenbach J, Blancher A, Muller-Trutwin M, Benecke A: Expression sequence tag library derived from peripheral blood mononuclear cells of the *Chlorocebus sabaues*. *BMC Genomics* 2012; **13**:279.
38. Teixeira DS, Castro LCG, Nóbrega YKM, Almeida RC, Gandolf L, Pratesi R: 25-Hydroxy-vitamin D levels among *Callithrix penicillata* primate species raised in captivity. *Am J Primatol* 2010; **39**:77-82.
39. Thomas L: Parathyroid hormone (PTH). *Clinical Laboratory Diagnosis*. TH-Books, Frankfurt. 1st english edition, 1998.
40. Thuita JK, Wolf KK, Murilla GA, Liu Q, Mutuku JN, Chen Y, Bridges AS, Mdachi RE, Ismail MA, Ching S, Boykin DW, Hall JE, Tidwell RR, Paine MF, Brun R, Wang MZ: Safety, Pharmacokinetic, and efficacy studies of oral DB868 in a first stage vervet monkey model of human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**:1-13.
41. Tortora GJ; Derrickson B: *Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
42. Van Coeverden SCCM, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA: Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol* 2002; **57**:107–116.
43. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA: Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**:149-158.
44. Yilmaz D, Ersoy B, Bilgin E, Gümüş G, Onur E, Pinar ED: Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters. *J Bone Miner Metab* 2005; **23**:476–482.

**Tabela 1:** Intervalos de referência (Mínimo – Máximo) das concentrações de marcadores ósseos de *Chlorocebus aethiops* (N = 73), com margem de confiança de 95%.

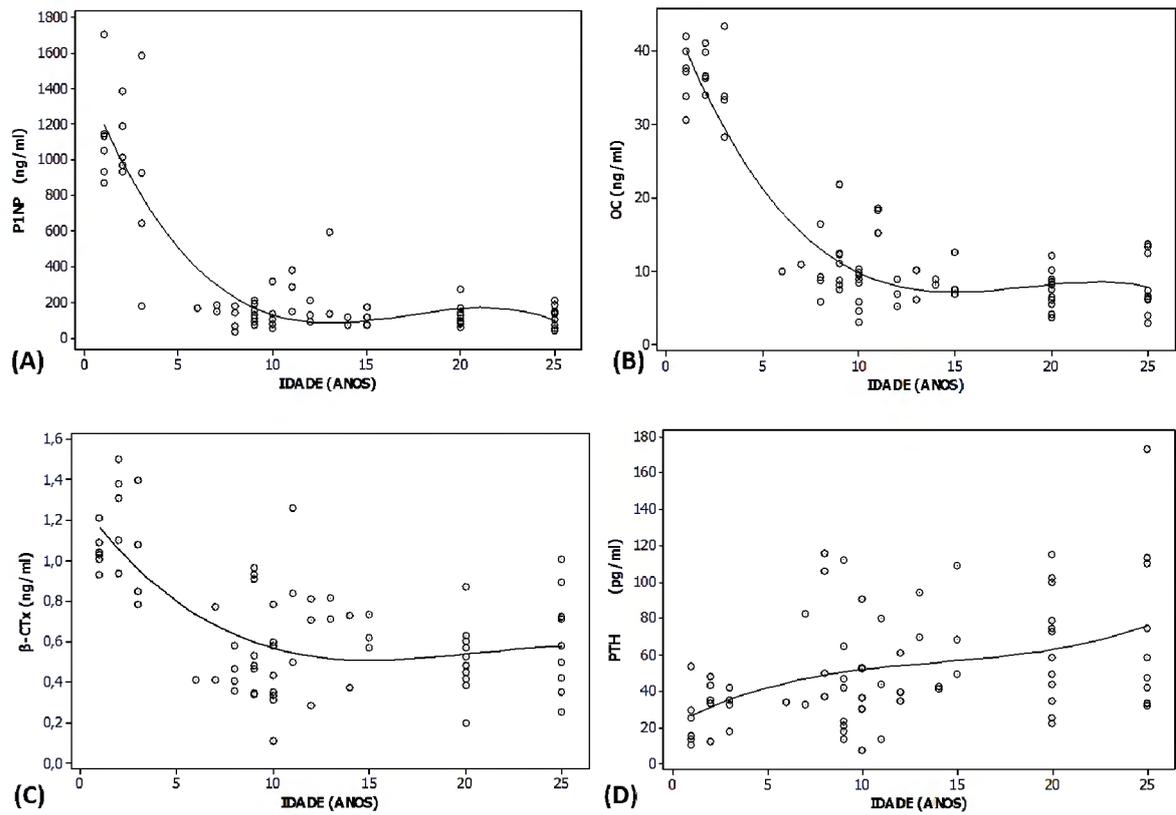
Variáveis	FE1	FE2	FE3	FE4
	Infanto-juvenis (1 – 3 anos)	Adultos jovens (6 – 9 anos)	Adultos (10 -15 anos)	Senis (20 – 25 anos)
PINP (ng/ml)	931,95 - 1663,37	73,76 - 199,82	94,77- 504,37	78,8 - 239,82
OC (ng/ml)	33,83 - 42,91	7,75 - 18,53	6,91 - 18,48	6,1 - 13,47
$\beta$ -CTX (ng/ml)	0,97 - 1,46	0,40 - 0,95	0,50 - 1,09	0,39 - 0,95
PTH (pg/ml)	16,33 - 51,73	30,67 - 114,35	39,3 - 103,21	36,06 - 142,9

Propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), Osteocalcina (OC),  $\beta$ -crosslap ( $\beta$ -CTX), Paratormônio (PTH). Mínimo e máximo correspondem a 2,5 e 97,5 percentil.

**Tabela 2:** Média  $\pm$  desvio padrão (DP) da massa corporal e dos marcadores ósseos de *Chlorocebus aethiops*, (N = 73), de acordo com o sexo e faixa etária (FE).

Variáveis	Sexo	FE1	FE2	FE3	FE4	Todas as FE
		Infanto-juvenis (1 – 3 anos)	Adultos jovens (6 – 9 anos)	Adultos (10 -15 anos)	Senis (20 – 25 anos)	
Massa Corporal (Kg)	♂	2,040 $\pm$ 0,69	4,956 <sup>A</sup> $\pm$ 0,54	4,755 <sup>A</sup> $\pm$ 0,60	4,768 <sup>A</sup> $\pm$ 0,95	4,288 <sup>A</sup> $\pm$ 1,34
	♀	2,039 $\pm$ 0,28	3,072 <sup>B</sup> $\pm$ 0,50	3,447 <sup>B</sup> $\pm$ 0,63	3,188 <sup>B</sup> $\pm$ 0,27	3,005 <sup>B</sup> $\pm$ 0,70
	♂♀	2,039 $\pm$ 0,50	4,118 $\pm$ 1,09	3,810 $\pm$ 0,85	4,193 $\pm$ 1,09	-
PINP (ng/ml)	♂	1189,74 $\pm$ 322,42	128,74 $\pm$ 36,78	124,33 $\pm$ 38,44	106,00 $\pm$ 42,46	325,60 $\pm$ 452,20
	♀	919,25 $\pm$ 74,66	119,08 $\pm$ 67,45	196,95 $\pm$ 158,38	136,92 $\pm$ 71,49	323,30 $\pm$ 373,10
	♂♀	1045,48 <sup>a</sup> $\pm$ 366,40	124,45 <sup>b</sup> $\pm$ 51,13	176,78 <sup>b</sup> $\pm$ 138,47	117,25 <sup>b</sup> $\pm$ 55,24	-
OC (ng/ml)	♂	37,15 $\pm$ 4,78	9,90 $\pm$ 2,47	10,58 $\pm$ 3,33	7,93 $\pm$ 2,78	14,52 $\pm$ 11,54
	♀	36,02 $\pm$ 4,08	8,86 $\pm$ 5,28	9,05 $\pm$ 4,62	7,51 $\pm$ 3,75	14,51 $\pm$ 12,25
	♂♀	36,55 <sup>a</sup> $\pm$ 4,30	9,44 <sup>b</sup> $\pm$ 3,87	9,48 <sup>b</sup> $\pm$ 4,26	7,78 <sup>b</sup> $\pm$ 3,08	-
$\beta$ -CTX (ng/ml)	♂	1,17 $\pm$ 0,21	0,61 $\pm$ 0,23	0,69 $\pm$ 0,35	0,52 $\pm$ 0,20	0,69 $\pm$ 0,33
	♀	1,06 $\pm$ 0,21	0,48 $\pm$ 0,20	0,57 $\pm$ 0,23	0,54 $\pm$ 0,26	0,65 $\pm$ 0,31
	♂♀	1,11 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	0,55 <sup>b</sup> $\pm$ 0,22	0,61 <sup>b</sup> $\pm$ 0,26	0,53 <sup>b</sup> $\pm$ 0,22	-
PTH (pg/ml)	♂	21,18 $\pm$ 9,70	61,82 $\pm$ 29,18	57,26 $\pm$ 17,25	77,79 $\pm$ 41,20	59,50 $\pm$ 36,46
	♀	37,02 $\pm$ 12,85	37,20 $\pm$ 32,98	52,49 $\pm$ 27,03	49,47 $\pm$ 27,03	45,18 $\pm$ 27,50
	♂♀	29,63 <sup>b</sup> $\pm$ 13,78	50,88 <sup>ab</sup> $\pm$ 32,51	53,81 <sup>ab</sup> $\pm$ 27,36	67,49 <sup>a</sup> $\pm$ 38,58	-

♂, Macho, ♀, Fêmea, ♂♀, Macho e fêmea. Propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), Osteocalcina (OC),  $\beta$ -crosslap ( $\beta$ -CTX), Paratormônio (PTH). Letras maiúsculas significa diferença entre as linhas, letras minúsculas significa diferença entre as colunas (P<0.05).



**Figura 2:** Correlação entre os níveis sorológicos de biomarcadores ósseos em função da idade (anos) de *Chlorocebus aethiops* (N = 73). (A) Propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP,  $r = -0.643$ ,  $P < 0.001$ ); (B) Osteocalcina (OC,  $r = -0.711$ ,  $P < 0.001$ ); (C)  $\beta$ -crosslap ( $\beta$ -CTX,  $r = -0.488$ ,  $P < 0.001$ ); (D) Paratormônio (PTH,  $r = 0.418$ ,  $P < 0.001$ ).