



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicabrasileira@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e

Traumatologia

Brasil

Sartori, Angélica Rossi; Moreira, Julieta Aparecida; Martins Santos, Antonio Marcos; Corrêa Cintra, Dennys Esper; Sartori, Lucas Rossi; Baraúna, Mário Antônio; Tavares Canto, Roberto Sérgio  
Comparação do processo de reparo ósseo em tibias de ratas normais e osteopênicas

Acta Ortopédica Brasileira, vol. 16, núm. 1, 2008, pp. 37-40

Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia

São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65713424007>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

**ARTIGO ORIGINAL**

# COMPARAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO TÍBIAS DE RATAS NORMAIS E OSTEOPÊNICAS

**BONE REPAIR PROCESS IN NORMAL AND OSTEOPENIC FEMALE RATS' TIBIAE:  
A COMPARATIVE STUDY**

ANGÉLICA ROSSI SARTORI<sup>1</sup>, JULIETA APARECIDA MOREIRA<sup>2</sup>, ANTONIO MARCOS MARTINS SANTOS<sup>3</sup>, DENNYS ESPER CORREIA<sup>4</sup>,  
LUCAS ROSSI SARTORI<sup>5</sup>, MÁRIO ANTÔNIO BARAÚNA<sup>6</sup>, ROBERTO SÉRGIO TAVARES CANTO<sup>7</sup>

**RESUMO**

O objetivo foi comparar a consolidação óssea em tíbias de ratas normais e osteopénicas. 49 ratas albinas fêmeas, linhagem Wistar, peso médio de 160 ( $\pm 20$ g) e 100 dias foram distribuídas em 2 grupos: Ooforectomizado (OOF) e Pseudo-ooforectomizado (Grupo controle - SHAM). 30 dias após a ooforectomia e/o cirurgia simulada, todas foram submetidas à produção de lesão óssea cortical. Foram sacrificadas na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas. Os osteoblastos foram contados. O peso aumentou progressivamente, porém as OOF apresentaram maior peso ( $p \leq 0,05$ ) quando comparadas as SHAM, à época da segunda cirurgia. 15 dias pós-lesão óssea, as OOF apresentaram maior número de osteoblastos ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados as SHAM. 30 dias pós-lesão óssea houve diminuição no número de osteoblastos, porém os valores foram equivalentes entre os dois grupos OOF e SHAM. 45 dias pós-lesão, apesar da diminuição constante de osteoblastos, o grupo OOF permaneceu elevado quando comparado ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). Aos 60 dias o grupo SHAM apresentou menos osteoblastos, sugerindo processo avançado de reparo ósseo. Os animais osteopénicos apresentaram resposta inicial acelerada à lesão óssea, possibilitando a equivalência entre os grupos 30 dias pós-lesão. Mas, após este período apresentaram retardos na mineralização do osteóide, sugerindo atraso tardio no processo de reparo ósseo.

**SUMMARY**

The purpose was to compare tibial bone union in normal and osteopenic female rats. Forty-nine Wistar albino female rats, weighing 160 g ( $\pm 20$ g) and 100 days were distributed in two groups: Oophorectomized (OOF) and Pseudo-oophorectomized (SHAM). Thirty days later, a cortical injury was produced in all the animals. They were sacrificed in the 2nd, 4th, 6th and 8th weeks. Osteoblasts count was performed. Progress of weight increase was observed, but the OOF group was heavier ( $p \leq 0,05$ ) than the SHAM group. At the time of the second surgery, the OOF group gained more weight ( $p \leq 0,05$ ) than the SHAM group. After 15 days post-injury, the OOF group presented a higher number of osteoblasts ( $p \leq 0,05$ ) compared to the SHAM group. Thirty days post-injury, the number of osteoblasts was reduced, but was similar between the groups. Forty-five days after the second surgery, the number of osteoblasts was reduced, but the OOF group remained high when compared to SHAM ( $p \leq 0,05$ ). After 60 days, we found less osteoblasts in the SHAM group, suggesting an advanced bone repair process. The osteopenic animals showed an early accelerated response, equivalent between both groups 30 days after the second surgery. After that period, they showed a delayed osteoid mineralization, suggesting delayed late bone repair process.

**Descriptores:** Osteoporose, Ovariectomia, Osteopenia.

**Keywords:** Osteoporosis, Ovariectomy, Osteopenia.

**Citação:** Sartori AR, Moreira J, Santos AMM, Cintra DEC, Sartori LR, Baraúna MA, Canto RST. Comparação do processo de reparo ósseo em tíbias de ratas normais e osteopénicas. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2008; 16(1):37-40. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

**Citation:** Sartori AR, Moreira J, Santos AMM, Cintra DEC, Sartori LR, Baraúna MA, Canto RST. Bone repair process in normal and osteopenic female rats: a comparative study. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

**INTRODUÇÃO**

Osteoporose é definida como distúrbio osteometabólico, de origem multifatorial, caracterizado pela diminuição de densidade mineral óssea e deterioração de sua microarquitetura, com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fraturas. No Brasil cerca de 10 milhões de pessoas são acometidas por essa doença e as fraturas são freqüentes<sup>(1,2)</sup>. Classificam-se em osteoporose primária pós-menopausa (Tipo I), Senil (Tipo II) e secundária<sup>(3)</sup>. O osso representa uma forma rígida de tecido conjuntivo que está em constante remodelação sendo, portanto, um tecido com elevada plasticidade. A forma e a densidade do tecido ósseo são

mantidas ao longo da vida por um equilíbrio entre processos fisiológicos e fisiopatológicos<sup>(4)</sup>. No esqueleto adulto o osso depositado pelos osteoblastos corresponde ao processo de reabsorção óssea osteoclástica<sup>(5)</sup>. Como resultado desse processo, o tecido ósseo é removido e substituído por novo tecido ósseo que é característico do período pós-menopausa, tanto no processo osteoblástica bem como a velocidade de depósito ósseo é reduzida. Consequentemente, a reabsorção óssea é maior que a deposição óssea, resultando em uma diminuição da relação ao depósito, reduzindo a massa óssea, que é característica de fraturas ósseas trabeculares<sup>(4, 6-9)</sup>. Fraturas resultantes da osteoporose são consideradas importante problema sócio-econômico.

**Trabalho realizado no Departamento de Fisioterapia do Centro Universitário do Triângulo – UNITRI – Uberlândia – MG.**  
**Endereço para correspondências:** Rua Alair Ferreira da Fonseca, 470 Jd. América – Alfenas – MG-Brasil - CEP:37130000 – E-mail: [gelsari@yahoo.com](mailto:gelsari@yahoo.com)

**1.** Mestre em Fisioterapia Traumato-Ortopédica (Centro Universitário do Triângulo - Unitri) – Universidade de Alfenas – Unifal.  
**2.** Bióloga – Universidade Federal de Alfenas – Unifal.  
**3.** Biólogo – Universidade de Alfenas – Unifal.



a alta freqüência de mortalidade e morbidade, reduzida qualidade e expectativa de vida e altos custos médicos<sup>(10-12)</sup>. Alguns autores concordam com o fato de que a consolidação de fraturas em idosos é um processo mais lento que em adultos jovens<sup>(13)</sup>. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o reparo ósseo em idosos não tem diferença em relação à adultos jovens no que se refere à velocidade de consolidação e sim quanto à qualidade do osso neoformado<sup>(1,2)</sup>. O objetivo deste estudo foi comparar o reparo ósseo pós-lesão em tibias de ratas osteopénicas e normais através da contagem de osteoblastos e da análise dos aspectos histológicos da consolidação óssea nas duas situações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** 49 ratas albinas fêmeas, linhagem Wistar, com peso corporal médio de  $160 \pm 20$  g e 100 dias de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade de Alfenas - Unifenas. Os animais foram mantidos durante todo o experimento, em ambiente higienizado e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados: Ooforectomizado (O) e Pseudo-ooforectomizado (Grupo controle) – Sham (S). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para Experimentação Animal do UNITRI – Centro Universitário do Triângulo

**1<sup>a</sup> Cirurgia – Procedimento cirúrgico de ooforectomia e cirurgia simulada de ooforectomia:** Vinte e cinco animais foram submetidos à cirurgia de ooforectomia. Inicialmente foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina e cloridrato de tiazina, na proporção de 3:1 respectivamente, com dose de 0,002mL/g de peso corporal. Em seguida a região do baixo ventre foi tricotomizada com lâmina e a antisepsia foi feita com álcool iodado. A incisão cirúrgica foi feita com lâmina de bisturi e uma pequena sutura com fio reabsorvível Categutte-Cromado (3-0), foi realizada na base uterina seguida pela ooforectomia bilateral e histerectomia. Ao final, as suturas internas foram feitas com fio reabsorvível e as externas com fio de nylon não reabsorvível. Os animais do grupo controle (Pseudo-ooforectomizados – SHAM – S) passaram pelas mesmas etapas cirúrgicas, com exceção da remoção do útero e ovários<sup>(14,15)</sup>.

**2<sup>a</sup> Cirurgia - Procedimento cirúrgico para produção de defeito ósseo cortical:** Trinta dias após a cirurgia de ooforectomia (1<sup>a</sup> cirurgia) os animais foram submetidos à cirurgia para produção de defeito ósseo cortical. Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados como descrito anteriormente. Durante o procedimento os animais foram mantidos na posição supina, com o membro esquerdo em rotação externa de quadril e tríplice flexão (quadril/joelho/tornozelo). Com um paquímetro posicionado a partir da interlinha articular do joelho até o maléolo medial, foi verificado e calculado o terço proximal da tibia, para a realização da lesão. Uma incisão correspondente na pele foi feita e fáscia miotendínea da região foi afastada e foi feita a lesão óssea por escareação, utilizando-se uma broca odontológica Carbide esférica em motor de baixa rotação. Em um único movimento a mesma foi introduzida a 90°, em relação ao eixo longitudinal, no centro do osso cortical da face medial da tibia (região diafisária), de modo a penetrar o osso cortical e lesar o trabeculado do canal medular, promovendo uma escareação com o diâmetro de 1,5 mm. Durante este procedimento, irrigação constante com soro fisiológico estéril foi mantida. Em seguida a pele foi suturada com fio não-absorvível e feita assepsia local com solução de PVPI (Polivinil Pirolidona Iodo), não havendo nenhum tipo de imobilização do segmento posteriormente<sup>(16,17)</sup>.

**Sacrifício:** Os animais foram sacrificados na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas respectivamente após a lesão óssea<sup>(18)</sup>, subgrupos I, II, III e IV

## Análise radiográfica:

Após o sacrifício as patas direitas foram desarticuladas e foram realizados exames radiográficos com as patas em tríplice flexão. Foram utilizadas películas Kodak® 35 mm identificadas. Os exames radiológicos foram utilizados como amostras que tiveram lesões ósseas completas

## Análise histológica:

As tibias direitas foram dissecadas e fixadas em mol a 10% por cinco dias e depois lavadas em água corrente por 24 horas. Foram então incluídas em solução desc. MORSE (citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 2%) e novamente lavados em água corrente por 24 horas. Posteriormente as peças foram desidratadas com soluções de álcool 70%, diafrinizada em álcool xilol, depois xilol e parafina. Foram realizados cortes longitudinais seriados de espessura, a cada corte desprezavam de 5 a 7 até o próximo, totalizando 3 cortes por peça. As lâminas foram coloridas por Hematoxilina / Eosina (HE)<sup>(19)</sup> e analisadas por microscópio de luz. Foram feitas fotos das extremidades direitas de cada corte, totalizando 6 fotos para cada amostra. Foi feito aumento de 40x. A análise morfométrica baseada na contagem de osteoblastos<sup>(20)</sup> foi feita usando uma tela milimétrica Adobe Photo-Paint – versão 6.0. A análise histológica pelo mesmo avaliador de forma aleatória e cega.

**Análise Estatística:** O teste de Wilcoxon foi usado para comparação entre peso corporal, os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para a variável contagem de osteoblastos. Para as diferenças significantes foi utilizado o teste de Duncan para a comparação entre as médias. Para todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

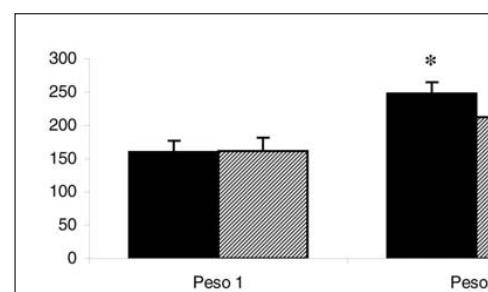
## RESULTADOS

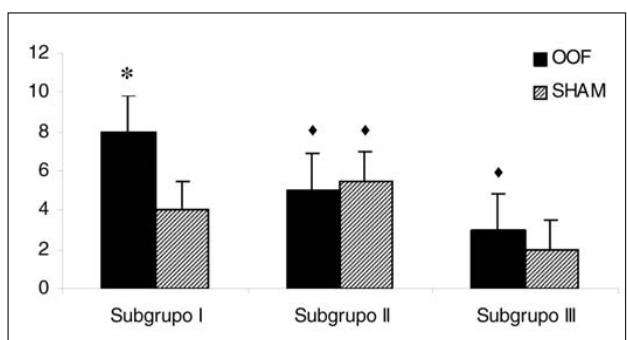
### Peso dos animais

Os pesos dos animais não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) quando submetidos à primeira cirurgia – Peso 1. Em ambos os grupos houve aumento estatisticamente significante no peso entre a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> cirurgia ( $p \leq 0,05$ ), porém os animais do grupo controle (SHAM) tiveram maior ganho de peso ( $p \leq 0,05$ ), quando comparado ao grupo ooforectomizado (OOF) (Figura 1).

### Contagem de osteoblastos e Aspectos histológicos

Os subgrupos OOF-I e OOF-III apresentaram uma quantidade significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados ao grupo SHAM (Figura 2). A contagem de osteoblastos só foi realizada nos grupos I, II e III. No grupo IV não foi possível, pois a lesão óssea já não se apresentava mais delimitada, haver uma consolidação óssea completa (Figura 3).

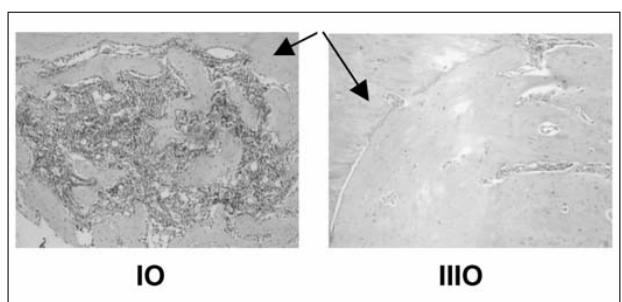




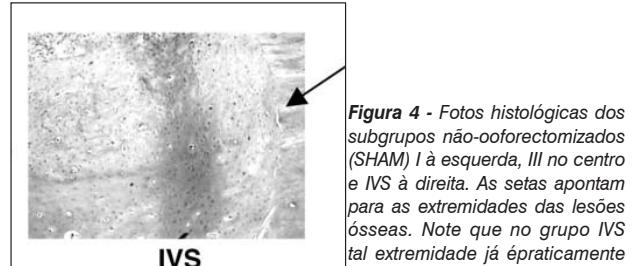
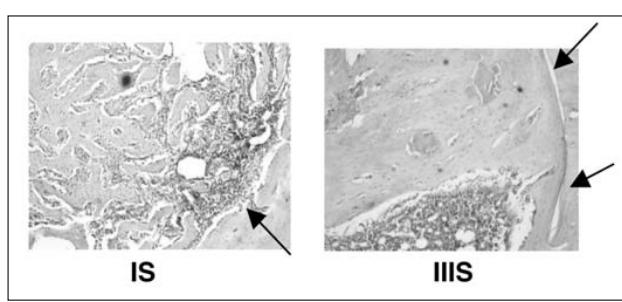
**Figura 2** - As barras representam as medianas e desvio-padrão do número de osteoblastos nos subgrupos experimentais.

\*  $p \leq 0,05$  diferente de todos os subgrupos SHAM.

♦  $p \leq 0,05$  diferente do subgrupo III SHAM.



**Figura 3** - Fotos histológicas dos subgrupos ooforectomizados (OOF) I à esquerda e III à direita. As setas apontam para as extremidades das lesões ósseas.



**Figura 4** - Fotos histológicas dos subgrupos não-ooforectomizados (SHAM) I à esquerda, III no centro e IVS à direita. As setas apontam para as extremidades das lesões ósseas. Note que no grupo IVS tal extremidade já é praticamente indistinguível.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, todos os animais tinham a mesma idade (100

OOF tiveram um ganho de peso significativamente quando comparado ao grupo SHAM. O estrogênio atua como energético enquanto em caso de hipoestrogenismo é menor com consequentemente aumento de peso. A privação dos hormônios ovarianos está relacionada de peso e diminuição da densidade mineral óssea (1,2,15,18). Clique et al<sup>(14)</sup> afirmaram que trinta dias após a cirurgia ooforectomizados apresentaram menor quantidade de fator em comparação aos animais não-ooforectomizados, portanto, ser um protocolo eficaz para a indução de osteoporose. Por isso o escolhido para este estudo. O grau de lesões moles interfere no modelo experimental de lesões ósseas. A tibia do rato oferece a vantagem de ter somente parte coberta por músculos. O modelo de lesões produz lesões idênticas em relação a posição e tamanho. Analisarmos a formação de osteóide e sua mineralização feitas contagens de osteoblastos. O grupo osteopênico teve maior atividade ostoblástica nos primeiros 15 dias pós-lesão ( $p \leq 0,05$ ). Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura<sup>(14)</sup> que relataram maior quantidade de osteoblastos em animais ooforectomizados, talvez como uma tentativa de aumentar acelerado da perda de massa óssea, ação do estrogênio. Houve uma redução na quantidade de osteoblastos 30 dias pós-lesão óssea com valores equivalentes entre os grupos OOF-II e SHAM-II, sugerindo uma equivalência de reparo ósseo nesse período, apesar da resposta retardada do grupo OOF. No período subsequente, 45 dias pós-lesão, apesar da constante diminuição no número de osteoblastos no grupo OOF-III permaneceu discretamente elevado em comparação ao grupo controle SHAM-III ( $p < 0,05$ ). Mas esse resultado pode possa ser explicado pelo número reduzido de animais no grupo SHAM devido à dificuldade de visualização das lesões ósseas, sugerindo que os animais do grupo SHAM estavam em estado avançado no processo de reparo ósseo em comparação com os animais do grupo OOF nesse período. No estudo, o número elevado de osteoblastos nos primeiros 30 dias pós-lesão no grupo OOF, pode também ser sugerido pela inicial da consolidação. Muitos estudos têm demonstrado que os animais osteopénicos apresentam atraso no processo de reparo das lesões ósseas (1,2,18). Os valores elevados de osteoblastos nos dois grupos (OOF e SHAM) 30 dias pós-lesão sugere que a tentativa de reverter o processo de perda óssea, através do acréscimo de osteoblastos na fase de reparo, demonstrando não haver diferenças entre os grupos nessa fase. Porém, 45 dias pós-lesão, pode ser considerado como a fase de remodelação, a qual os valores elevados de osteoblastos no grupo OOF em comparação ao grupo SHAM pode ser sugestivo de atraso na formação de matriz osteóide e consequentemente atraso na mineralização óssea, pelo prolongamento da fase de calcificação endocortical, aumentando o período de remodelação (1,2,15,18). Os animais podem consolidar-se mesmo sob condições de baixa densidade mineral e baixos níveis de estrogênio. Porém, a deficiência de hormônio atrasa o processo de acréscimo de matriz osteóide. Assim, o tecido ósseo neoformado nos animais 45 dias pós-lesão óssea, apresenta alterações osteoporóticas, exemplo, baixos valores para as propriedades mecânicas, quantidade de osso mineral e diminuição da densidade óssea, sugerindo uma qualidade óssea inferior (1,2,15,18,25). O estrogênio só diminui a densidade mineral como atenua o processo de perda óssea pós-fratura<sup>(15)</sup>. Osteoporose afeta o período de remodelação e a mineralização do calo tardivamente. As propriedades



na diminuição do período de tratamento, bem como, em melhores condições de reabilitação. Os resultados deste trabalho sugerem que o reparo pós lesão em ossos osteoporóticos segue a mesma sequência de eventos que em ossos normais, porém apresentando uma ligeira aceleração inicial, nos primeiros 15 dias, sendo que no período subsequente de 30 dias não houve diferença entre o reparo nos dois tipos de ossos, de acordo com as variáveis analisadas. Porém, após este período os ossos osteoporóticos apresentaram

um retardado no período de reparo por permanecerem com maior de tempo na fase de mineralização do osteo-

#### AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem às Professoras Helena Chaves e Ana Duarte da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aos Professores Hercílio Martelli Júnior e Luiz Antônio da Faculdade de Odontologia de Alfenas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999; 68:197-202.
- 2- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001; 28:80-6.
- 3- Gali JC. Osteoporose. *Acta Ortop Bras* 2001; 9: 53-62.
- 4- Pereira SRM, Mendonça LMC. Osteoporose e osteomalácia. In: Gorzoni ML, Rocha SM. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.???
- 5- Sambrook P, Schrieber L, Taylor T, Ellis A. O sistema musculoesquelético. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
- 6- Lewin S, Gouveia CHA, Marone MMS. Vertebral and femoral bone mineral density of 724 caucasian Brazilian women: influence of age and body weight. *Rev Assoc Med Bras*. 1997; 43:127-36.
- 7- Botell M. Osteoporosis em la menopausia, prevención y estratéjias terapéuticas atuales. *Rev Cub Obst Ginecol*, 2001; 27:199-204.
- 8- Bonduki CE, Haidar MA, Lima GR. Effect of estrogen-progestin hormonal replacement therapy on plasma antithrombin III of postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:330-3.
- 9- Guarniero R. Osteoporose In: Hebert S. Ortopedia e traumatologia - Princípios e prática. Porto Alegre: Artmed; 2003, 763-5.
- 10- Anjos L. Fraturas do fêmur proximal em idosos. *Rev Bras Med*, 1999; 56:1013-24.
- 11- Ramalho AC, Lazaretti-Castro M, Hauache O, Vieira JG, Takata Cafalli F, et al. Osteoporotic fractures of proximal femur: clinical and epidemiological features in a population of the city of São Paulo. *São Paulo Med J*. 2001; 119:48-53.
- 12- ossos de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras*. 2003; 11:17-22.
- 13- Meyer RA Jr, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, et al. Ovariectomy and ovariectomy impair both the normalization of mechanical accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res*. 2001; 19:35-41.
- 14- Giordano V, Giordano M, Knackfuss IG, Apfel MI, Gomes P, et al. Effect of mechanical load on fracture healing in rat tibiae. *Injury*. 2003; 34:85-94.
- 15- Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Hoffling MA. Laser effect on bone healing. *Appl Surf Sci*. 2000; 154-155, 548-54.
- 16- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH. Ehrlich's tumor in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res*. 1997; 339:339-45.
- 17- Marino JAM, Taciro C, Zuanon JAS, Benatti Neto C, Parizotto Neto, et al. Efeito terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea de ratos. *Rev Bras Fisioter*. 2003; 7:167-73.
- 18- Morisco AS, Carneiro J, Abrahamsohn PA. Histologia para a área de reabilitação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- 19- Guyard B, Fricker J, Brigant L, Betouille D, Apfelbaum M. Effect of ovariectomy on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Acta Endocrinol (Edinb)*. 2001; 144:529-33.
- 20- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines for osteoporosis. *Bone*. 1995; 17:(4 Suppl):125S-133S.
- 21- Vasconcellos LS, Leite JM, Sabino KR, Petrolani L. Influência da variação podenral em ratas jovens e adultas. *Arq Bras Endocrinol e Imunol*. 2004; 48:299-304.
- 22- Bak B, Jensen S. Standardization of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1995; 66:138-42.
- 23- Han SM, Szarzanowicz TE, Ziv I. Effect of ovariectomy and