



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 tíbias 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 NAS  
TÍBIAS DE RATAS NORMAIS E OSTEOPÊNICASBONE REPAIR PROCESS IN NORMAL AND OSTEOPENIC FEMALE RATS' TIBIAE:  
A COMPARATIVE STUDYANGÉLICA ROSSI SARTORI<sup>1</sup>, JULIETA APARECIDA MOREIRA<sup>2</sup>, ANTONIO MARCOS MARTINS SANTOS<sup>3</sup>, DENNYS ESPER CORRÊA<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 osteopênicas. 49 ratas albinas fêmeas, linhagem Wistar, peso médio de 160 ( $\pm 20$ g) e 100 dias foram distribuídas em 2 grupos: Ooforectomizada (OOF) e Pseudo-ooforectomizada (Grupo controle - SHAM). 30 dias após a ooforectomia e/ou cirurgia simulada, todas foram submetidas à produção de lesão óssea cortical. Foram sacrificadas na 2ª, 4ª, 6ª e 8ª 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 comparadas 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 osteopênicos apresentaram resposta inicial acelerada à lesão óssea, possibilitando a equivalência entre os grupos 30 dias pós-lesão. Mas, após este período apresentaram retardo 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 into two groups: Oophorectomized (OOF) and Pseudo-oophorectomized (SHAM). Thirty days later, a cortical injury was performed in the animals. They were sacrificed in the 2nd, 4th, 6th and 8th weeks. Osteoblasts count was performed. Progressively, the weight increased, but the OOF group was heavier ( $p \leq 0.05$ ) than the SHAM group at the time of the second surgery. 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 after the injury, the number of osteoblasts was reduced, but the values were equivalent between both groups. Forty-five days after the injury, despite the constant reduction, the number of osteoblasts 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 to the bone injury, allowing the equivalence between both groups 30 days after injury. However, after that period, they showed a delayed osteoid mineralization, suggesting delayed late bone repair process.

**Descritores:** 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 osteopênicas. *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' tibiae: a comparative study. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2008; 16(1):37-40. 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 conseqüente 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 a formação e a reabsorção<sup>(4)</sup>. No esqueleto adulto o osso depositado pelos osteoblastos corresponde ao osso reabsorvido pelos osteoclastos<sup>(5)</sup>. Como resultado o osso apresenta um balanço positivo, o mesmo que é característico do período pós-menopausa, quando a reabsorção osteoclástica é maior que a deposição osteoblástica bem como a velocidade de depósito é reduzida. Consequentemente, a reabsorção óssea supera a deposição, reduzindo a massa óssea, principalmente em ossos trabeculares<sup>(4, 6-9)</sup>. Fraturas resultantes de 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 Alaor Ferreira da Fonseca, 470 Jd. América - Alfenas - MG-Brasil- CEP:37130000 - E-mail: [gelsart@yahoo.com](mailto:gelsart@yahoo.com)

1. Mestre em Fisioterapia Traumatológica-Ortopédica (Centro Universitário do Triângulo - Unutri) - Universidade de Alfenas - Unifenas e Centro Universitário do Triângulo - Unutra.  
2. Bióloga - Universidade Federal de Alfenas - Unifal.  
3. Biólogo - Universidade de Alfenas - Unifenas.



a alta frequência 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 tíbias de ratas osteopênicas 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.

**1ª 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>.

**2ª Cirurgia - Procedimento cirúrgico para produção de defeito ósseo cortical:** Trinta dias após a cirurgia de ooforectomia (1ª 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 tríple flexão (quadril Joelho/tornozelo). Com um paquímetro posicionado a partir da interlinha articular do joelho até o maléolo medial, foi verificado foi calculado o terço proximal da tíbia, 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 tíbia (região diafisária), de modo a penetrar no 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 2ª, 4ª, 6ª e 8ª 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 tríple flexão. Foram utilizadas películas Kodak® 3-120 identificadas. Os exames radiológicos foram utilizados para identificar as amostras que tiveram lesões ósseas completas.

## Análise histológica:

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

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

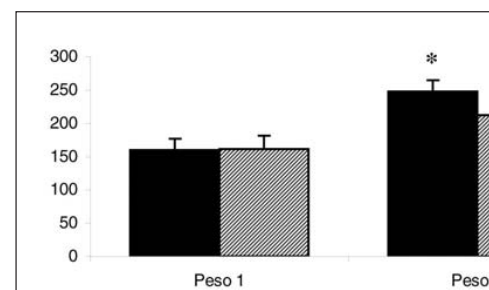
## RESULTADOS

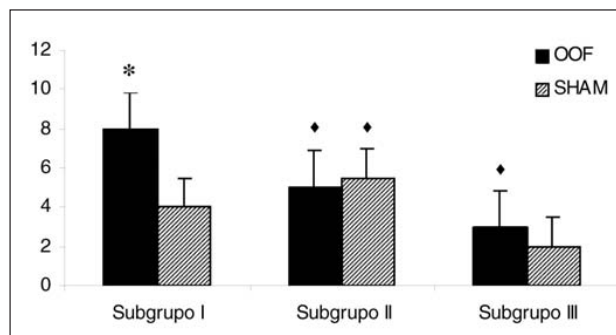
### Peso dos animais

Os pesos dos animais não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando submetidos à primeira cirurgia (SHAM – S) e ao peso 1. Em ambos os grupos houve aumento de peso entre a 1ª e a 2ª cirurgia ( $p \leq 0,05$ ), porém o grupo OOF-I teve maior ganho de peso ( $p \leq 0,05$ ), quando comparado ao grupo controle (SHAM) à época da segunda cirurgia (Figura 1).

### Contagem de osteoblastos e Aspectos histológicos

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

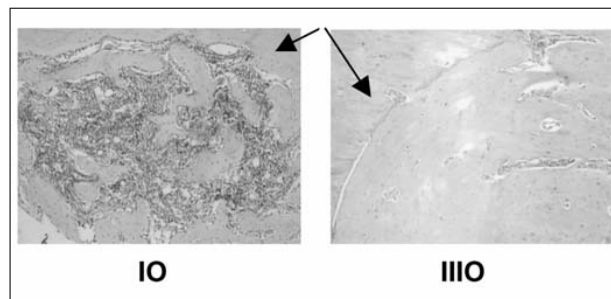




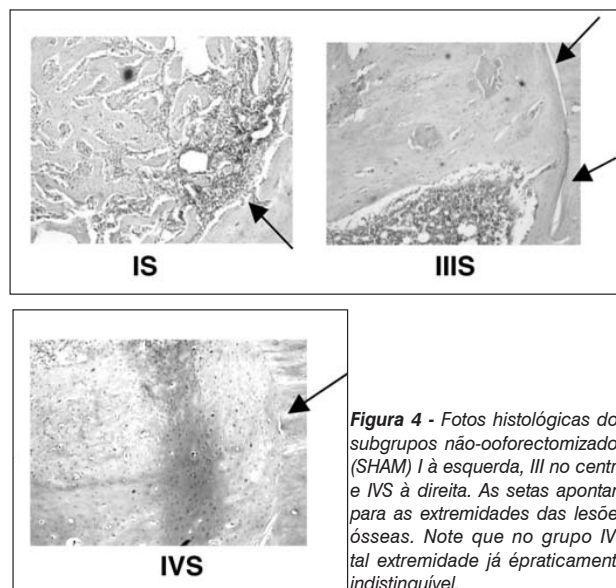
**Figura 2** - As barras representam as medianas e desvio-padrão do número de osteoblastos nos subgrupos experimentais.

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

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



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



**Figura 4** - Fotos histológicas dos subgrupos não-ovariectomizados (SHAM) I à esquerda, II no centro e IV à direita. As setas apontam para as extremidades das lesões ósseas. Note que no grupo IV 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 hipostrogenismo é menor com consequentemente aumento de peso. A privação dos hormônios ovarianos está relacionada de peso e diminuição da densidade mineral óssea e Cliquet<sup>(14)</sup> afirmaram que trinta dias após a cirurgia ovariectomizados apresentaram menor quantidade de osso mineral em comparação aos animais não-ovariectomizados, portanto, ser um protocolo eficaz para a indução de osteoporose por isso o escolhido para este estudo. O grau de osteoporose dos moles interfere no modelo experimental de lesão da tibia do rato oferece a vantagem de ter somente uma parte coberta por músculos. O modelo de lesão experimental produz lesões idênticas em relação a posição e tamanho analisamos a formação de osteóide e sua mineralização feitas contagens de osteoblastos. O grupo osteopênico apresentou maior atividade osteoblástica nos primeiros 15 dias pós-lesão (p<0,05). Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura<sup>(14)</sup> que relataram maior quantidade de osteoblastos em animais ovariectomizados, talvez como uma tentativa de aumentar o aumento acelerado da perda de massa óssea, a falta de estrogênio. Houve uma redução na quantidade de osso em 30 dias pós-lesão óssea com valores equivalentes aos grupos OOF-II e SHAM-II, sugerindo uma equivalência de reparo ósseo nesse período, apesar da resposta tardada do grupo OOF. No período subsequente, 45 dias pós-lesão, apesar da constante diminuição no número de osteoblastos, o grupo OOF-III permaneceu discretamente elevado quando comparado ao grupo controle SHAM-III (p<0,05). Mas isso pode ser explicado pelo número reduzido de animais no grupo SHAM devido à dificuldade de visualização das lesões, sugerindo que os animais do grupo SHAM estavam em estado avançado no processo de reparo ósseo. Comparados com os animais do grupo OOF nesse período de estudo, o número elevado de osteoblastos nos primeiros dias pós-lesão no grupo OOF, pode também ser sugestivo da fase inicial da consolidação. Muitos estudos têm demonstrado que os animais osteopênicos apresentam atraso no processo de reparo das lesões ósseas<sup>(1,2,18)</sup>. 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, funcionando, demonstrando não haver diferenças significativas entre os grupos nessa fase. Porém, 45 dias pós-lesão, o grupo OOF pode ser considerado como a fase de remodelação, a partir dos valores elevados de osteoblastos no grupo OOF e comparado ao grupo SHAM pode ser sugestivo de atraso de mineralização da matriz osteóide e consequentemente atraso na reparação pelo prolongamento da fase de calcificação endossquelética aumentando o período de remodelação<sup>(1,2,15,18)</sup>. Os animais podem consolidar-se mesmo sob condições de baixa densidade mineral e baixos níveis de estrogênio. Porém, a deficiência do hormônio atrasa o processo de acréscimo de mineralização óssea. Assim, o tecido ósseo neoformado nos animais 45 dias pós-lesão óssea, apresenta alterações osteoporóticas, por exemplo, baixos valores para as propriedades mecânicas, quantidade de osso mineral e diminuição da densidade mineral, sugerindo uma qualidade óssea inferior<sup>(1,2,15,18,25)</sup>. O estudo só diminui a densidade mineral como atenua o grau de osteoporose pós-fratura<sup>(15)</sup>. Osteoporose afeta o período de reparo e a mineralização do calo tardiamente. As propriedades



- 1- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yosnioka 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 estrategias terapéuticas actuales. *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 E, Cafalli F, et al. Osteoporotic fractures of proximal femur: clinical and epidemiological features in a population of the city of São Paulo. *Sao Paulo Med J*. 2001; 119:48-53.
- 12- Meyer RA Jr, Tshahak P, Martin DF, Banks DM, Harrow ME. The effects of ovariectomy and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res*. 2000; 18:35-40.
- 13- Giordano V, Giordano M, Knackfuss IG, Apfel MI, Gomes F. Bone healing after cam on fracture healing in rat tibiae. *Injury*. 2003; 34:85-94.
- 14- Freitas IG, Baranauskas V, Cruz-Hofling MA. Laser effect on bone healing. *Appl Surf Sci*. 2000; 154-155, 548-54.
- 15- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlichling I in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res*, 1997; 339:125-33.
- 16- Marino JAM, Taciro C, Zuanon JAS, Benatti Neto C, Parizotto T. Efeito terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em ratos. *Rev Bras Fisioter*. 2003; 7:167-73.
- 17- Morisco AS, Carneiro J, Abrahamsohn PA. Histologia para áreas de reabilitação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
- 18- Guyard B, Fricker J, Brigant L, Betoulle D, Apfelbaum M. Effect of steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Am J Physiol*. 2004; 286:R1023-33.
- 19- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines for the use of bone mineral density (BMD) measurements in clinical trials for osteoporosis. *Bone*. 1995; 17(4 Suppl):125S-133S.
- 20- Vasconcellos LS, Leite JM, Sabino KR, Petrioliand L. Influência da variação podal em ratos jovens e adultos. *Arq Bras Med*. 2004; 48:299-304.
- 21- Bak B, Jensen S. Standardization of tibial fractures in the rat. *J Orthop Res*. 1989; 7:1289-95.
- 22- Han SM, Szarzanowicz TE, Ziv I. Effect of ovariectomy and ovariectomy on bone mineral density and mechanical properties of the rat tibia. *J Orthop Res*. 1999; 17:1289-95.