

Alguns eventos morfológicos do processo de reparo de falha óssea diafisária no rádio esquerdo de ratos tratados com fenobarbital

Some morphological events of the healing of diaphisary bone failure in the left radius of rats under phenobarbital treatment

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Antonio Marcos Orsi
Departamento de Anatomia
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da UNESP
Distrito de Rubião Júnior
18618-000 - Botucatu - SP
e-mail: amorsi@ibb.unesp.br

1-Departamento de Clínicas
Veterinárias Estadual de Londrina-PR
2-Departamento de Histologia da
Universidade Estadual de Londrina-PR
3-Departamento de Anatomia da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da UNESP, Botucatu -SP

Nilva Maria Freres MASCARENHAS¹; Nilce Marzolla IDERIHA²; Antonio Marcos ORSI³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos morfológicos do tratamento prolongado com fenobarbital, na consolidação de falha óssea diafisária, induzida no rádio esquerdo de rato. Ratos machos albinos da linhagem Wistar, com 40 dias de idade, foram divididos em dois grupos. O grupo experimental foi tratado com fenobarbital (Gardenal[®]) na dose de 105 mg/kg de peso corpóreo, por via subcutânea, no período de até 90 dias. O grupo controle foi tratado, de modo similar, com solução de NaCl 0,9%. No 30º dia de tratamento, os animais foram submetidos a cirurgia para produção de falha óssea diafisária de 2 mm, no rádio esquerdo. Após 20, 40 e 60 dias de cirurgia, os ratos foram sacrificados por inalação de éter etílico, e o rádio esquerdo foi coletado, fixado e processado para rotina histológica de microscopia óptica com análises morfométricas. As falhas ósseas diafisárias dos ratos experimentais mostravam menor fração de volume de tecido ósseo neoformado, comparativamente com as falhas ósseas diafisárias dos ratos controle. Os resultados observados foram indicativos de que o tratamento prolongado com fenobarbital inibe a osteogênese em osso longo, retardando o processo de reparo de falha óssea diafisária em rato.

UNITERMOS: Morfologia; Ossos; Fenobarbital; Ratos.

INTRODUÇÃO

Em humanos, conhece-se que o tratamento prolongado com drogas anticonvulsivantes pode levar a alterações na homeostasia do cálcio^{11,14}, redução da espessura da parede dos osteons², com diminuição da massa óssea^{2,11,14}. Ratos tratados com fenobarbital apresentaram peso corpóreo significativamente mais baixo e aumento da área cartilaginosa, associada a calcificação fraca e irregular do disco epifisário, na extremidade distal do rádio⁵.

O uso de drogas anticonvulsivantes é relativamente freqüente em Clínica Veterinária, em animais com seqüelas neurológicas¹. Por outro lado, é grande a incidência de fraturas com perda de tecido ósseo em cães, vítimas de atropelamentos automobilísticos, ferimentos por armas de fogo ou quedas⁴.

Assim sendo, com base nessas informações, este estudo tem por objetivo investigar os eventos morfológicos de

diferenciação óssea, durante o processo de reparo de falha óssea diafisária no rádio esquerdo de ratos, submetidos a tratamento prolongado com fenobarbital. Além das observações morfológicas, por intermédio dos resultados experimentais obtidos, dentro do possível, visa-se extrapolar os resultados para as condições de tratamento clínico acompanhado, em animais domésticos, a exemplo do cão, tratados por tempo prolongado com anticonvulsivantes

MATERIAL E MÉTODO

Neste trabalho, foram utilizados 36 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com 40 dias de idade inicial, sendo divididos em dois grupos de estudos: controle e experimental. Os roedores foram mantidos em gaiolas contendo dois animais por gaiola, sendo alimentados com ração (Labina[®], Purina, Brasil) e água *ad libitum*.

Os ratos do grupo experimental foram tratados com uma dose diária de 105 mg/kg de peso corporal, de fenobarbital⁹ (Gardenal®, Rhodia, Brasil), sendo o anticonvulsivante administrado por via subcutânea, durante 50, 70 e 90 dias precedentes ao sacrifício. Os ratos do grupo controle foram tratados do mesmo modo, com igual volume de solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%.

No 30º dia de tratamento, os ratos de ambos os grupos foram submetidos a cirurgia para produção de falha óssea diafisária de 2 mm, no rádio esquerdo¹⁶. Imediatamente a seguir, todos os animais receberam uma dose única de penicilina benzatina (Benzetacil®, Wyeth/White-Hall, Brasil), na dose de 30.000 UI/kg de peso corpóreo, administrada por via intraperitoneal. Aos 20, 40 e 60 dias de pós-operatório, correspondentes a 50, 70 e 90 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por inalação de éter etílico.

Após sacrifício, os antebraços foram desarticulados na altura das articulações do cotovelo e do punho; os tecidos moles foram rapidamente removidos; a peça óssea conjunta do rádio e ulna foi fixada e simultaneamente descalcificada em Bouin, através de passagem de uma corrente elétrica de 80 mA⁶, em geladeira durante 15 dias. A descalcificação óssea completou-se com a transferência das peças para uma solução de EDTA 7,0%, pH 7,0, à temperatura ambiente, por mais 15 dias.

Posteriormente à descalcificação, as peças foram seccionadas ao meio, longitudinalmente, e desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 95% e 100%). A diafanização foi feita em óleo de cedro, durante 7 dias. A inclusão das preparações, para estudos histológicos, foi feita em paraplast, e os cortes semi-seriados (7 µm) obtidos foram corados com Hematoxilina-Eosina; (HE), destinando-se para análises morfológica e morfométrica, em nível de microscopia

óptica.

A fração de volume relativo do tecido de preenchimento da falha óssea foi estimada pelo método de contagem de pontos. A estimativa do número total de pontos foi calculada com 5% de erro médio relativo¹³. Para a contagem dos pontos foi utilizada a Ocular Integradora Zeiss KPL de 8x com 100 pontos, e objetiva de 40x. Foram analisados, morfometricamente, 50 campos, num total de 5.000 pontos, para cada intervalo de 20, 40 e 60 dias de período pós-operatório. Nos dois grupos: controle e experimental, os campos histológicos analisados foram observados aleatoriamente, obedecendo-se ao critério de varredura horizontal e mantendo-se fixa a ocular integradora.

O tratamento estatístico dos dados obtidos pela análise morfométrica, em ambos os grupos, foi feito por meio de análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey, com nível de significância de 6%.

RESULTADOS

Análise morfométrica

As médias das frações de volume dos componentes do tecido de preenchimento da falha óssea dos ratos controle e experimentais, ao longo do processo de reparo, estão registradas na Tab. 1.

A fração de volume do tecido conjuntivo, em ambos os grupos, apresenta diminuição progressiva ao longo do processo de reparo ósseo. Contudo, esta fração de volume é significativamente maior nos ratos experimentais, aos quarenta dias após a cirurgia, sendo correspondente a setenta dias de tratamento com o fenobarbital.

A cartilagem articular aumenta de espessura

Tabela 1

Frações de volume expressas em porcentagem (%) dos elementos tissulares constituintes das falhas ósseas ao longo do processo de reparo ósseo, em dias, nos ratos controle e experimentais.

Elémentos Tissulares (Tecidos)	Falhas Ósseas	Período pós-operatório em dias		
		20 (50)	40 (70)	60 (90)
Tecido Conjuntivo	Nos Ratos			
	Controle	58,05%	35,41%	27,07%
Cartilagem	Experimentais	63,39%	50,38%*	29,59%
	Controle	23,73%	36,46%	44,25%
Osso Neoformado	Experimentais	11,37%	34,18%	53,06%
	Controle	6,86%	14,21%	14,42%
Medula Óssea	Experimentais	4,79%	5,95%**	9,75%
	Controle	7,13%	6,01%	12,98%
	Experimentais	4,19%	7,99%	7,77%

Obs.: Os números (%) representam a média aritmética de observações feitas em 4 ratos por grupo (controles experimentais).

* Diferença mínima significativa em nível de 5%;

** Diferença mínima significativa em nível de 6%;

() Dias de tratamento com o fenobarbital.

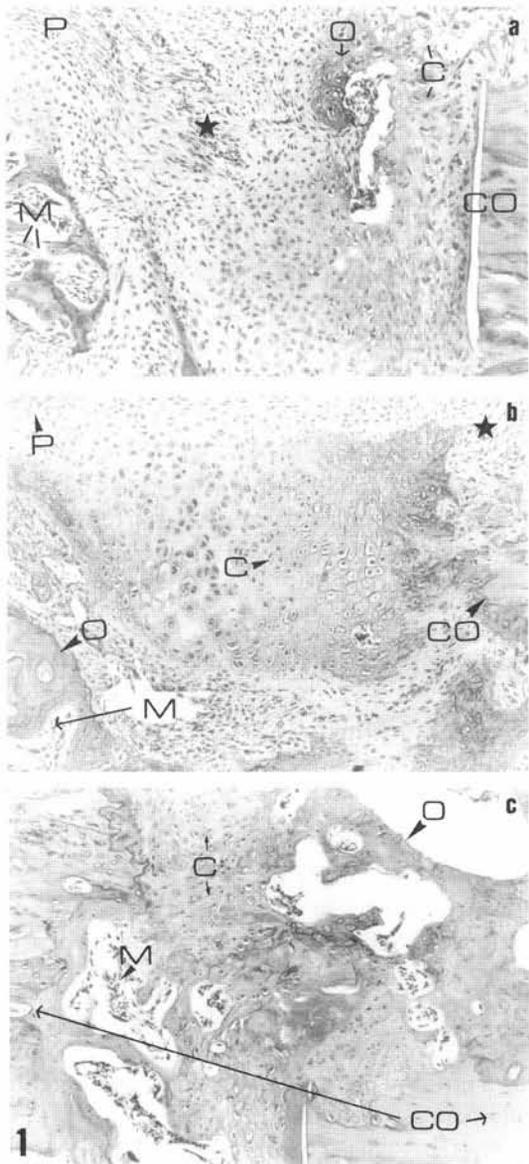


Figura 1

Fotomicrografias de falhas ósseas de ratos controle aos 20 dias (a), 40 dias (b) e 60 dias (c) de pós-operatório: periosteio (P), células osteogênicas (estrela), área de condrogênese (C), trabéculas de tecido ósseo primário (O), medula óssea (M), coto ósseo (CO). HE, 120X.

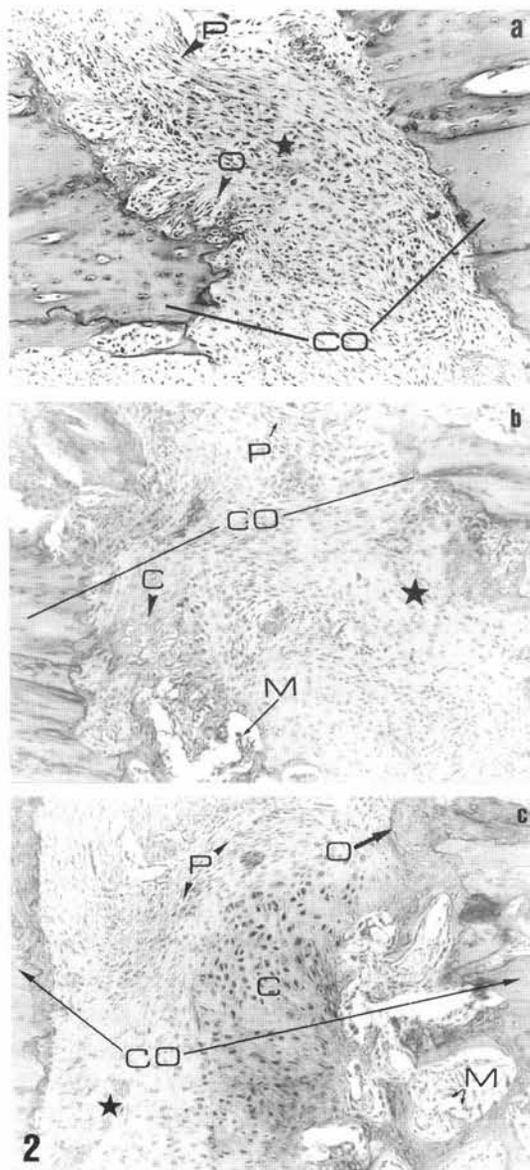


Figura 2

Fotomicrografias de falhas ósseas de ratos experimentais aos 20 dias (a), 40 dias (b) e 60 dias (c) de pós-operatório, sendo indicados os mesmos elementos estruturais apontados na Fig. 1. HE, 120X. reparo (P1).

gradativamente, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental. Não se observa diferença significativa na espessura da cartilagem articular em ambos os grupos.

Quanto à fração de volume do tecido ósseo neoformado, verifica-se um aumento progressivo, em ambos os grupos, porém é sempre menor nos ratos experimentais. Ao nível de significância igual a 5%, as frações de volume tissular não diferem entre si. Entretanto, ao nível de significância igual a 6%, a fração de volume do grupo experimental apresenta-se significativamente menor aos quarenta dias após a cirurgia.

A medula óssea diminui ligeiramente aos quarenta dias

após a cirurgia, aumentando aos sessenta dias no grupo controle, enquanto, no grupo experimental, a fração de volume da medula óssea mostra-se aumentada aos quarenta dias, e se estabiliza aos sessenta dias de pós-operatório.

Análise morfológica

Grupo controle:

Nos ratos controle, aos vinte dias de pós-operatório, a análise morfológica do tecido de preenchimento da falha óssea permite observar, em sua periferia, espessamento do periosteio,

com células osteogênicas que se infiltram preenchendo-a. Na região central da falha óssea, visualizam-se áreas típicas de condrogênese, com condrócitos em vários estágios de diferenciação. Junto aos condrócitos, nota-se invasão vascular e presença de tecido ósseo neoformado, caracterizando-se as etapas iniciais do processo de ossificação endocondral (Fig. 1a).

Aos quarenta dias de pós-operatório, nota-se a formação do calo ósseo externo, onde as células osteogênicas periostais, nas regiões avasculares, diferenciam-se como células cartilaginosas, em diferentes fases de maturação. Assim, observam-se condroblastos e condrócitos jovens hipertróficos que se degeneram, resultando em tabiques de matriz cartilaginosa, que se calcifica, sobre os quais progressivamente é depositado tecido ósseo neoformado. Simultaneamente, observa-se nas proximidades dos cotos ósseos a formação do calo ósseo interno, constituído por trabéculas de tecido ósseo primário neoformado. As trabéculas são formadas a partir de células osteogênicas, provenientes do endóstio e da região medular do rádio, assemelhando-se a um processo de ossificação intramembranosa. No espaço delimitado pelas trabéculas ósseas, visualizam-se células de medula óssea (Fig. 1b).

Aos sessenta dias de pós-operatório, observam-se ainda células osteogênicas do perióstio adentrando a falha óssea, que mostra maior preenchimento tissular em sua região central. Notam-se áreas de condrócitos, localizadas próximas ao tecido ósseo neoformado. Estas áreas cimentam os cotos ósseos e abrigam células da medula óssea, localizadas na região central da falha óssea (Fig. 1c).

Grupo Experimental:

Nos ratos experimentais, à semelhança dos ratos controle, observa-se na falha óssea uma discreta reação periostal e intensa proliferação de células de tecido conjuntivo, porém com resposta óssea morfogenética menos intensa, por parte do receptor. Assim sendo, aos vinte dias de pós-operatório, notam-se células osteogênicas do perióstio que adentram a região da falha óssea e assumem, mais centralmente, um sentido longitudinal em relação aos fragmentos ósseos. Acompanhando as células osteogênicas, verifica-se proliferação de tecido conjuntivo intensamente celular e, cimentadas à parte morta dos cotos ósseos, visualizam-se escassas trabéculas ósseas recém-formadas (Fig. 2a).

Aos quarenta dias de pós-operatório, nota-se espessamento do perióstio que reveste a falha óssea e, mais centralmente, se observa predomínio de tecido conjuntivo com características osteogênicas. Este tecido é rico em células osteogênicas, mostrando áreas escassas de cartilagem, em

diversas fases de diferenciação, e discreta osteogênese. As células de medula óssea encontram-se circundadas por trabéculas ósseas recém-formadas (Fig. 2b).

Aos sessenta dias de pós-operatório, visualizam-se células osteogênicas do perióstio que continuam adentrando a falha óssea. Esta é parcialmente preenchida por um número maior de células cartilaginosas e por pouco tecido ósseo neoformado. Concomitantemente a estes eventos morfogenéticos, as cavidades trabeculares que abrigam células da medula óssea fundem-se em cavidades maiores (Fig. 2c).

DISCUSSÃO

A análise morfológica do tecido de preenchimento da falha óssea nos ratos controle, aos sessenta dias após a cirurgia, demonstrou a presença de tecido cartilaginoso e de escassas áreas de tecido ósseo neoformado.

A produção experimental de falha óssea pode fornecer um modelo adequado, para a simulação de casos de não-união óssea. Nesses casos, assim como naqueles de descontinuidade de substância óssea provocada por fratura óssea, caracteriza-se a presença de tecido conjuntivo fibroso, localizado entre as extremidades vivas do osso fraturado. A neoformação óssea nestas falhas ocorre somente nas margens do osso, contendo no seu interior ilhas de cartilagem que não se calcificam e se associam a colágeno denso¹⁵.

Nos animais experimentais, particularmente, observou-se que o fenobarbital provocou diminuição da massa óssea, evidenciada pelas análises morfológica e morfométrica.

Ao se investigarem crianças tratadas com anticonvulsivantes, por longo tempo em ambulatório, foram relatadas diminuição da densidade mineral óssea, que foi detectada por fotoabsorciometria direta^{3,7}. O fenobarbital, dentre os anticonvulsivantes analisados, foi o que provocou maior redução de massa óssea por área tissular analisada⁷.

Outra descrição⁸ atribuiu os efeitos do fenobarbital sobre o osso e sobre o metabolismo mineral ósseo a sua habilidade em estimular o sistema enzimático microssomal hepático. Em consequência há um aumento do metabolismo e excreção da vitamina D, e depressão dos seus metabólitos biologicamente ativos. Em condições normais, estes metabólitos da vitamina D são responsáveis pela absorção intestinal do cálcio. Juntamente com o paratormônio, mobilizam o cálcio ósseo para manter os níveis normais de calcemia. Ora, com a depressão induzida pelo fenobarbital, ocorre a inibição da absorção óssea mediada pelo paratormônio. Logo, para se manterem os níveis normais de calcemia, tende a ocorrer hiperparatireoidismo secundário⁸.

Os anticonvulsivantes, além de provocarem alteração do metabolismo da vitamina D, inibem a secreção da

tireocalcitonina¹¹. Em condições normais, a calcitonina inibe a reabsorção óssea, porém, com a inibição de sua secreção, ocorrem reabsorção esquelética e perda de massa óssea.

Neste estudo, notou-se que a fração de volume de tecido ósseo neoformado foi inferior nos ratos tratados com fenobarbital, ao longo de todo o experimento. Esta diferença foi significativa ao nível de 6% aos sessenta dias de tratamento, relativamente às observações feitas nos ratos controle.

Como suporte, talvez, à consideração anterior¹², em exames de biópsia óssea, em pacientes epiléticos hospitalizados, tratados por tempo prolongado com anticonvulsivantes, observou-se que havia uma fração de volume de osso trabecular menor, do que em indivíduos não submetidos a tratamento similar¹². A osteoporose notada^{10,12} poderia ser explicada pela reduzida atividade física dos pacientes hospitalizados, associando-se ainda a pronunciada osteomalacia e a hiperparatireoidismo¹².

Tendo em vista os resultados obtidos nesta investigação, e com base nas observações antes comentadas, pôde-se

concluir que ocorre inibição da osteogênese, retardando assim o processo de reparo de falha óssea diafisária do rádio esquerdo de ratos submetidos a tratamento prolongado com fenobarbital.

Em termos teóricos, provavelmente, os resultados obtidos nesta investigação poderiam ser extrapolados para os animais domésticos de pequeno porte, como o cão. Sabe-se que o cão, na clínica veterinária, pode ser tratado por tempo prolongado com fenobarbital, ao apresentar seqüelas neurológicas pós-traumáticas¹⁴. Contudo, as semelhanças ou diferenças, espécie-específicas, necessitam ser consideradas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu auxílio financeiro da Universidade Estadual de Londrina e do CNPq, por meio do Programa de Recursos Humanos em Áreas Estratégicas (RHAE). Os autores são gratos ao técnico Mário Antônio Alves da Cunha, pelo auxílio na parte laboratorial, e à Senhora Maria Luiza Nogueira Rossetto Rodrigues, pela revisão do manuscrito.

SUMMARY

The aim of this report was to investigate in the albino rat the morphological effects of prolonged treatment with phenobarbital on the repair of induced diaphysary bone failure of the left radius. Forty-day-old experimental male rats (*Rattus norvegicus albinus*) were treated daily with subcutaneous dose of 105 mg/kg weight of phenobarbital (Gardenal, Rhodia®), for 50, 70 and 90 days of treatment. A control group was treated daily with 0.9% NaCl isotonic solution for the same periods, similar to the experimental rats. On the 30th day of treatments a 2 mm diaphysary bone failure was surgically made in the left radius of the rats of the both groups. The left radius was collected *post-mortem* on 20th, 40th and 60th days after the surgeries and was processed histologically for light microscope studies, with emphasis to morphometric analyses. The diaphysary bone failures of experimental rats showed a lesser volumetric range of renewed osseous tissue, when compared to the osseous tissue regeneration presented in diaphysary bone failures of control rats. The results allowed to conclude that phenobarbital prolonged treatment inhibits the osteogenesis in long bones, retarding the process of diaphysary bone failure repair in rat.

UNITERMS: Morphology; Bones; Phenobarbital; Rats.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BRAUND, K.G. Encephalitis and meningitis. *Veterinary Clinics of North America*, v.10, p.31-56, 1980.
- 2- BROULIK, P.; KRAGSTRUP, J.; MOSEKILDE, L., *et al.* Osteon cross-sectional size in the iliac crest: variations in normals and patients with osteoporosis, hyperparathyroidism, acromegaly, hypothyroidism and treated epilepsy. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica, Series A*, v.90, p.339-44, 1982.
- 3- CHUNG, S.; AHN, C. Effects of anti-epileptic drug therapy on bone mineral density in ambulatory epileptic children. *Brain Development*, v.16, p.382-5, 1994.
- 4- DALY, W.R. Femoral head and neck fractures in the dog and cat: a review of 115 cases. *Veterinary Surgery*, v.1, p.29, 1978.
- 5- GASCON-BARRÉ, M.; CÔTÉ, M.G. Influence of phenobarbital and diphenylhydantoin on the healing of rickets in the rat. *Calcified Tissue Research*, v.25, p.93-7, 1978.
- 6- GONÇALVES, R.P.; OLIVÉRIO, L.C. Electrical decalcification of bone. *Mikroskopie*, v.20, p.154-6, 1965.
- 7- GUICHOT-GARCIA, M.R.; LLUCH-FERNANDEZ, M.D.; RAMOS-SANCHES, I. Evaluation of the bone mass by dual-photon absorptiometry in children, under prolonged anticonvulsant therapy. *Annales Españoles de Pediatría*, v.37, p.109-13, 1992.

- 8- HAHN, T.J. Bone complications of anticonvulsants. **Drugs**, v.12, p.201-11, 1976.
- 9- KLAASSEN, C.D. A. Effects of phenobarbital on the plasma disappearance and biliary excretion of drugs in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.175, p.289-300, 1970.
- 10- KRUSE, R. Osteopathien bei antiepileptischer Langzeittherapie. **Monatsschrift Kinderheilkunden**, v.116, p.378-81, 1968.
- 11- KRUSE, K.; BARTELS, H.; ZIEGLER R., *et al.* Parathyroid function and serum calcitonin in children receiving anticonvulsant drugs. **European Journal of Pediatrics**, v.133, p.151-6, 1980.
- 12- NILSSON, O.S.; LINDHOLM, T.S.; ELMSTEDT, E., *et al.* Fracture incidence and bone disease in epileptics receiving long-term anticonvulsant drug treatment. **Archives of Orthopedy and Trauma Surgery**, v.105, p.146-9, 1986.
- 13- SCHAEFER, A. Micro-stereology. The mathematical basis of stereology. **New Development Technics Wild Heerbrug Precip of Instrumentation and Makers Microscopic Division**, v.7, p.3-12, 1970.
- 14- SCHMID, F. Osteopathien bei antiepileptischer Dauerbehandlung. **Fortschrift Medizin**, v.85, p.381-2, 1967.
- 15- SCHMITZ, J.P.; SCHWARTZ, Z.; HOLLINGER, J.O., *et al.* Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anatomica**, v.138, p.185-92, 1990.
- 16- VOLPON, J.B. Homologous graft of granulated and decalcified cortical bone in the correction of diaphyseal bone defect. An experimental study in rabbits. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.17, p.11-9, 1982.

Recebido para publicação: 16/10/1998
Aprovado para publicação: 26/02/1999