

UNIVERSIDADE DE UBERABA – UNIUBE

JULIA PERINOTTO PICELLI

INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS (*Rattus
novergicus*)

UBERABA - MG

2021

JULIA PERINOTTO PICELLI

INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS (*Rattus
novergicus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba – UNIUBE, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, sob a orientação da Prof.^a Dra. Isabel Rodrigues Rosado e coorientação do Prof. Dra. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

UBERABA - MG

2021

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

P582i Picelli, Julia Perinotto.
Influência da obesidade na reparação óssea em ratos (*Rattus norvegicus*) / Julia Perinotto Picelli. – Uberaba, 2021.
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado.

Coorientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Ratos. 4. Ortopedia veterinária. I. Rosado, Isabel Rodrigues. II. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 616.398

JULIA PERINOTTO PICELLI

INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS (*Rattus norvegicus*).

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 27/08/2021

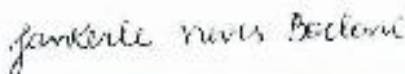
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Isabel Rodrigues Rosado - Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Ian Martin
Universidade de Uberaba



Prof.^a. Dr.^a. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”

– John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sidnei Picelli e Selma Regina Perinotto Picelli, agradeço pelo amor incondicional, suporte e exemplos de vida. Aos meus irmãos, Luiz Rodrigo Perinotto Picelli e Natalia Perinotto Picelli, pela melhor das amizades e por ensinarem-me o apreço pela leitura. Aos meus avós, Therezinha de Jesus Pedrasol Perinotto, Alcides Perinotto, Maria Domingas Cecatto Picelli e Pedro Picelli, pelo carinho e por serem exemplos de força. Ao meu namorado, Helbert Eduardo Noventa, por ser meu melhor amigo e meu porto seguro. À Olívia, pela companhia e carinho.

Agradeço imensamente à Prof^ª. Dra. Isabel Rodrigues Rosado, orientadora e amiga, pelos ensinamentos e pelas diversas oportunidades que me proporcionou neste período. Ao meu coorientador Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves por todo o conhecimento, paciência e amizade.

Às grandes amigas e parceiras de mestrado, Juliana Gonzaga da Silva, Trayse Graneli Soares, Marina Cazarini Madeira e Nathali Adrielli Agassi de Sales, pelo companheirismo e suporte nas horas boas e difíceis deste processo.

Aos colegas de turma, que tornaram as aulas mais ricas e prazerosas.

Aos técnicos de laboratório Andrea Cristina Costa, Camilla Beatriz da Silva, Luiz Fernando Vaz de Oliveira e Marcelo Silveira Hermeto, por me ensinarem e auxiliarem no processamento das muitas amostras deste projeto, e por tornarem meus dias mais alegres com suas amizades.

Aos alunos de Iniciação Científica Franciele Neuza Bizinoto, Henrique Mendonça Imada, Júlia Ciabotti Sedassari Galvão, Mariana Almeida Ferreira, Michelle Lucas Faria, Paola Stephanie Queiroz do Amaral, Pedro Henrique Cardoso Fideles e Victória Gabriela Silva Souza por toda a ajuda neste experimento.

Às secretárias do programa de mestrado, Lanamara Batista Gomes e Flávia Michele da Silva, por todo o carinho, auxílio e apoio.

Aos demais professores da pós-graduação, André Belico de Vasconcelos, Ian Martin, Mauricio Scoton Igarasi e Renato Linhares Sampaio, que com seus conhecimentos contribuíram para a minha formação.

Aos professores Ian Martin e Jankerle Neves Boeloni, por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação, e aos professores Bruno Machado Bertassoli e Eustáquio Resende Bittar, por se disporem a ser avaliadores suplentes caso se faça necessário.

À Universidade de Uberaba, cuja os recursos financeiros e a infraestrutura permitiram a execução deste projeto.

À CAPES – PROSUP pela concessão da bolsa de estudos.

E, por fim, aos animais utilizados neste experimento pelo temperamento dócil mesmo nos momentos desconfortáveis.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi desenvolvido com recursos financeiros da Universidade de Uberaba (Uniube) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A obesidade é considerada uma epidemia em humanos e em animais de companhia. É definida como um transtorno patológico caracterizado pelo acúmulo excessivo de gordura a níveis superiores ao necessário para o funcionamento orgânico. Esta desordem pode causar problemas ortopédicos e alterar a reparação óssea. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da obesidade na reparação óssea utilizando um modelo animal (*Rattus norvegicus*) submetido a dieta experimental para indução da obesidade e a lesão óssea induzida. Os animais foram divididos em dois grupos, obeso (n=30) e não obeso (n=30), sendo que o primeiro recebeu dieta hipercalórica rica em carboidratos simples e o segundo, dieta comercial balanceada para roedores durante 60 dias. Cada grupo foi submetido à ostectomia monocortical proximal de tíbia, com exceção dos animais controle (sem lesão óssea), e dividido em grupos de acordo com os tempos de avaliação: dia três (n=6), sete (n=6), 19 (n=6) e 28 (n=6) após a lesão óssea, e em grupos controle (n=6). Os animais foram eutanasiados nos tempos supracitados. Os grupos controles foram eutanasiados aproximadamente no sétimo dia. A obesidade foi avaliada por meio dos dados de massa corporal, IMC, circunferência abdominal, massa das gorduras viscerais e índice de adiposidade; e a reparação óssea foi avaliada por meio dos dados de composição óssea (massa óssea, massa óssea orgânica e massa óssea mineral), do teste de flexão em três pontos, histomorfometria e por meio da análise histológica do foco da lesão. Os resultados obtidos neste estudo mostraram aumento significativo dos parâmetros indicativos de obesidade nos animais submetidos à dieta experimental, massa óssea mineral maior nos animais obesos, assim como melhores resultados nos parâmetros mecânicos avaliados neste grupo, se recuperando mais precocemente do que o grupo não obeso. A histologia revelou reparação óssea do tipo primária com formação de trabéculas ósseas mais espessas no grupo obeso ao sétimo dia. Conclui-se que os efeitos mecânicos ocasionados pela sobrecarga de peso sobre os ossos na obesidade parecem não interferir – e por vezes até ter efeitos positivos – na reparação óssea do tipo primária.

Palavras-chave: obeso; lesão óssea; dieta hipercalórica; tecido adiposo; massa corporal; reparação óssea primária.

ABSTRACT

Obesity is considered to be an epidemic in humans and pets. It is defined as a pathological disorder characterized by excessive accumulation of fat at higher levels than necessary for organic functioning. This disorder can cause orthopedic problems and alter bone repair. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of obesity on bone repair using an animal model (*Rattus norvegicus*) submitted to an experimental diet to induce obesity and to an induced bone injury. The animals were divided into two main groups, obese (n=30) and non-obese (n=30), the first of which received a hypercaloric high-refined carbohydrate diet, and the second of which received a balanced commercial diet for rodents for 60 days. Each group was submitted to a proximal tibial monocortical osteotomy, except for the control groups (with no bone injury), and then divided according to the evaluation times in days three (n=6), seven (n=6), 19 (n=6) and 28 (n=6) after bone injury, and a control group (n=6). Each group was euthanized on the days aforementioned. The control groups were euthanized approximately on day seven. Obesity was assessed through data on body mass, BMI, waist circumference, visceral fat mass and adiposity index; and bone repair was evaluated through bone composition data (bone mass, organic bone mass and mineral bone mass), three point bending test, histomorphometry and histological analysis of lesion site. Results showed a significant increase in parameters indicative of obesity in animals submitted to the experimental diet, significantly higher mineral bone mass in obese animals, as well as better results in the mechanical parameters evaluated in this group, and earlier recover when compared to the non-obese group. Bone histology revealed primary bone healing with formation of thicker bone trabeculae in the obese group on the seventh day. In conclusion, the mechanical effects caused by weight overload on the bones in obesity do not seem to interfere - and sometimes even have positive effects - in primary bone healing.

Keywords: obese; bone lesion; hypercaloric diet; adipose tissue; body mass; primary bone healing.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição centesimal da dieta experimental hipercalórica rica em carboidratos simples utilizada para indução da obesidade em ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) machos da linhagem Wistar submetidos ou não à ostectomia monocortical proximal de tíbia para estudo da influência da obesidade na reparação óssea.....	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem ilustrativa da divisão dos grupos obeso (n=30) e não obeso (n=30), cada um em quatro tempos de avaliação, dia três (D3), dia sete (D7), dia 19 (D19) e dia 28 (D28), que correspondem aos dias após a indução da lesão óssea para os animais submetidos à osteotomia monocortical proximal de tíbia (três, sete, 19 e 28), e um grupo controle não submetido à lesão óssea, configurando seis animais por grupo, para estudo da influência da obesidade na reparação óssea 34
- Figura 2.** Imagem ilustrativa da mensuração da circunferência abdominal (A) e do comprimento nasoanal (B) de rato (*Rattus norvegicus*) macho de linhagem Wistar para estudo da influência da obesidade na reparação óssea..... 36
- Figura 3.** Imagem ilustrativa de procedimento cirúrgico de osteotomia monocortical proximal de tíbia para estudo da influência da obesidade na reparação óssea em rato (*Rattus norvegicus*) macho de linhagem Wistar. (A) Pele incisionada e subcutâneo divulsionado. (B) Realização de osteotomia monocortical proximal de tíbia com furadeira autoclavável de rotação controlada e broca de 2 mm. (C) Remoção de partículas ósseas com solução salina estéril sob pressão moderada. (D) Defeito ósseo monocortical proximal de tíbia. (E) Síntese com fio de poliamida 4-0..... 38
- Figura 4.** Imagem ilustrativa do teste de flexão em três pontos em tíbia submetida à osteotomia monocortical proximal em máquina universal de ensaios, com a lesão voltada para baixo (seta azul), e programação em velocidade de 2 mm/minuto, distância de apoio de 20 mm e pré-carga de 20 g, a fim de se encontrar os valores de força máxima e de deformação até a falha para estudo da influência da obesidade na reparação óssea em ratos (*Rattus norvegicus*) machos de linhagem Wistar..... 40
- Figura 5.** Gráfico das médias e desvios-padrão da circunferência abdominal (cm) de ratos obesos e não obesos submetidos à osteotomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão para estudo da influência da obesidade na reparação óssea. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no pré-operatório e pela cor preta nos dias de avaliação do grupo não obeso; e pelo padrão hachurado branco no pré-operatório e hachurado preto nos dias de avaliação do grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) .44

Figura 6. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa corporal (g) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão para estudo da influência da obesidade na reparação óssea. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no pré-operatório e pela cor preta nos dias de avaliação do grupo não obeso; e pelo padrão hachurado branco no pré-operatório e hachurado preto nos dias de avaliação do grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$)..... 45

Figura 7. Gráfico do IMC. (A) Médias e desvios-padrão do IMC de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no grupo não obeso e pela cor preta no grupo obeso. (B) Médias e desvios-padrão do IMC de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia no período pré-operatório e aos três, sete, 19 e 28 dias após serem submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia. Diferença entre os grupos indicadas pela cor branca no pré-operatório e preta nos dias três, sete, 19 e 28 dias após a lesão no grupo não obeso, e pelo padrão hachurado branco no pré-operatório e hachurado preto nos dias três, sete, 19 e 28 dias após a lesão no grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$)... 47

Figura 8. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa do tecido adiposo visceral (g) de ratos obesos e não obesos submetidos ou não à ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no grupo não obeso e pela cor preta no grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 48

Figura 9. Gráfico das médias e desvios-padrão do índice de adiposidade (IA) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 49

Figura 10. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa óssea (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 50

Figura 11. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa óssea orgânica (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 51

Figura 12. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa óssea mineral (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 52

Figura 13. Gráfico das médias e desvios-padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 53

Figura 14. Gráfico das médias e desvios-padrão da deformação até a falha (μm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos

e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 54

Figura 15. Gráfico das médias e desvios-padrão do módulo de elasticidade (N/mm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a ostectomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 55

Figura 16. Micrografia do osso neoformado em defeitos ósseos de tíbias de ratos (*Rattus norvegicus*) obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete 19 e 28 dias após a lesão, para estudo da influência da obesidade na reparação óssea. Observar que a reparação óssea ocorreu de forma primária, que aos sete dias o osso neoformado é esponjoso e que aos 28 dias o processo de remodelação se encontra avançado. Hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. Barra = 200 μm 56

Figura 17. Gráfico das médias e desvios-padrão da área do tecido ósseo ($\times 10^6 \mu\text{m}^2$) de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 57

Figura 18. Gráfico das médias e desvios-padrão do número de osteócitos no foco da lesão de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$) 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das circunferências abdominais (cm) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.....	44
Tabela 2. Médias e desvios-padrão das massas corporais (g) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão	45
Tabela 3. Médias e desvios-padrão do IMC de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão	46
Tabela 4. Médias e desvios-padrão da massa dos tecidos adiposos viscerais (g) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.....	48
Tabela 5. Médias e desvios-padrão do índice de adiposidade (IA) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	49
Tabela 6. Médias e desvios-padrão da massa óssea (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.....	50
Tabela 7. Médias e desvios-padrão da massa óssea orgânica (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	51
Tabela 8. Médias e desvios-padrão da massa óssea mineral (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	52

Tabela 9. Médias e desvios-padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	53
Tabela 10. Médias e desvios-padrão da deformação até falha (μm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	54
Tabela 11. Médias e desvios-padrão do módulo de elasticidade (N/mm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a ostectomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.....	55
Tabela 12. Médias e desvios-padrão da área do tecido ósseo ($\times 10^6 \mu\text{m}^2$) no foco da lesão de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	57
Tabela 13. Médias e desvios-padrão do número de osteócitos no foco da lesão de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico	58

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Certificado do comitê de ética em experimentação animal.....	80
ANEXO II: Protocolo de preparo de dieta hipercalórica rica em carboidratos simples	81
ANEXO III: Protocolo de preparo de EDTA 10% (pH 7,4) – 1 litro	82
ANEXO IV: Protocolo de preparo de PBS 1,5 molar – 1 litro	83
ANEXO V: Protocolo de preparo de PBS 0,15 molar – 1 litro	84
ANEXO VI: Inclusão de tecido ósseo em parafina	85
ANEXO VII: Coloração em hematoxilina e eosina	86
ANEXO VIII: Protocolo de determinação da composição óssea	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COX-2	Cicloxigenase-2
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
FOXO1	Forkhead Box O1
GH	Hormônio de crescimento
IA	Índice de Adiposidade
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
MST	Gordura mesentérica
OPG	Osteoprotegerina
PGN	Gordura perigonadal
RANK	Receptor ativador de NF-kappa beta
RANKL	RANK ligante
RTP	Gordura retroperitoneal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS.....	23
REVISÃO DE LITERATURA	24
Obesidade	24
Impacto social e econômico da obesidade.....	25
Alterações ortopédicas associadas à obesidade	25
Impacto social e econômico das alterações osteomusculares.....	27
Anatomia e histologia óssea	28
Reparação óssea.....	29
Teste de flexão em três pontos	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Aspectos éticos	33
Animais.....	33
Manejo dos animais	33
Dietas	34
Monitoramento do ganho de massa corporal.....	35
Técnica anestésica e profilaxia antimicrobiana	36
Antissepsia e preparação do campo operatório	37
Defeito ósseo monocortical proximal da tíbia.....	37
Pós-operatório imediato e mediato	38
Eutanásia dos animais e coleta das amostras.....	38
Índice de adiposidade	39
Teste de flexão em três pontos	39
Preparo das amostras ósseas para histologia e histomorfometria.....	41
<i>Descalcificação óssea com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%.....</i>	<i>41</i>
<i>Preparo das lâminas histológicas para análises histomorfológica e histomorfométrica das tíbias</i>	<i>41</i>
Análises histomorfológica e histomorfométrica das tíbias.....	41
Avaliação da composição óssea	42
<i>Massa óssea.....</i>	<i>42</i>

<i>Massa óssea orgânica</i>	42
<i>Massa óssea mineral</i>	42
Análise estatística	42
RESULTADOS	44
Circunferência abdominal	44
Massa corporal.....	45
Índice de massa corporal	45
Massa do tecido adiposo visceral	47
Índice de adiposidade	48
Massa óssea	49
Massa óssea orgânica.....	50
Massa óssea mineral	51
Força máxima	52
Deformação até falha.....	53
Módulo de elasticidade.....	54
Avaliação histológica e histomorfometria.....	55
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

INTRODUÇÃO

Obesidade é um transtorno patológico caracterizado pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (Osto & Lutz, 2015). Em humanos, a obesidade é considerada uma epidemia (Eckel, 2002; Reilly *et al.*, 2003; Daniels, 2006; Raffan, 2013) e está associada a inúmeras enfermidades, como o diabetes mellitus, afecções cardíacas, hipertensão, osteoartrite, infertilidade, neoplasias, asma, distúrbios graves de natureza psicossocial e à redução da expectativa de vida (Bray, 2004; Tamashiro *et al.*, 2009; Sandoe *et al.*, 2014; Osto & Lutz, 2015).

Nas últimas décadas, a incidência da obesidade também cresceu drasticamente nos animais de companhia (Osto & Lutz, 2015). É atualmente um dos problemas de saúde mais comuns que afetam os cães e gatos, estimando-se uma prevalência de 34 a 59% em cães e 25 a 63% em gatos (Linder & Mueller, 2014). Nestas espécies, a obesidade também já foi relacionada a várias afecções, como desordens respiratórias (García-Guasch *et al.*, 2014), ortopédicas (Marshall *et al.*, 2010; Schwetz *et al.*, 2012; Scheller *et al.*, 2016), urinárias (Heneger *et al.*, 2001, Lund *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2006), dermatológicas (Scarlet & Donoghue, 1998; Tobin *et al.*, 2013; Hirt *et al.*, 2019), oncológicas (Lim *et al.*, 2015), endócrinas, hepáticas, cardíacas, reprodutivas e um maior risco anestésico (Nicoll *et al.*, 1998; Raffan, 2013; Sandoe *et al.*, 2014; Weeth, 2016). Estes problemas de saúde, além de reduzirem a expectativa de vida destes animais, reduzem igualmente sua qualidade de vida (Sandoe *et al.*, 2014).

Condições musculoesqueléticas estão entre as principais causas de dor crônica, deficiência física e ausência no trabalho, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo (Planell, 2009). Defeitos ósseos podem decorrer de traumas, ressecção de tumores, infecções, malformações congênitas e cirurgias reconstrutivas (Majidinia *et al.*, 2017). Primordialmente acreditava-se que a obesidade tinha efeitos estritamente positivos sobre os ossos (Cao, 2011; Scheller *et al.*, 2016), especialmente sobre a força óssea (Savvidis *et al.*, 2018), havendo relação positiva entre massa gorda e a densidade do osso trabecular (Edwards *et al.*, 2015). Esses efeitos positivos se devem ao estímulo mecânico que a massa corpórea exerce sobre formação óssea (Scheller *et al.*, 2016). Embora a obesidade promova este estímulo mecânico aparentemente benéfico aos ossos, a inflamação sistêmica de baixo grau advinda da obesidade é potencialmente danosa (Savvidis *et al.*, 2018). Assim, os efeitos positivos da massa corporal na densidade mineral óssea não prevalecem sobre os prejuízos causados pela obesidade na qualidade óssea (Shapses *et al.*, 2017). Sabe-se que a obesidade pode causar problemas

ortopédicos por diversos fatores (Schwetz *et al.*, 2012). As alterações ósseas oriundas da obesidade são graves e podem prevalecer mesmo após a perda de peso (Scheller *et al.*, 2016). Várias patologias osteomusculares já foram associadas à obesidade, como a displasia coxofemoral, ruptura do ligamento cruzado cranial (Vasconcellos *et al.*, 2015), doença articular degenerativa e doença do disco intervertebral (Frye *et al.*, 2016), mas não foram encontrados estudos que comprovassem a interferência da obesidade na reparação de fraturas. Visando obter mais informações sobre esse tema, o presente estudo avaliou a influência da obesidade na reparação óssea de ratos.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da obesidade na reparação óssea por meio da massa óssea, massa óssea orgânica, massa óssea mineral, do teste de flexão em três pontos e da histologia (histomorfologia e histomorfometria) das tíbias de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal.

REVISÃO DE LITERATURA

Obesidade

A obesidade é um transtorno patológico multifatorial crônico (Linder & Mueller, 2014) caracterizado pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (Osto & Lutz, 2015). Esta condição resulta principalmente do balanço energético positivo (Bray, 2004), mas pode também decorrer de distúrbios endócrinos, como o hipotireoidismo e o hiperadrenocorticismo (Sandoe *et al.*, 2014), de fatores sociais e ambientais (Linder & Mueller, 2014), da exposição prolongada a alguns fármacos, como corticosteroides e anticonvulsivantes, e de defeitos genéticos (Osto & Lutz, 2015). A energia em excesso é estocada em adipócitos, os quais aumentam em número e/ou tamanho. Esta hiperplasia e hipertrofia das células adiposas causa os problemas clínicos associados à obesidade, seja pela massa ou volume da gordura sobreabundante, seja pela crescente secreção de substâncias potencialmente prejudiciais por estas células, como ácidos graxos e peptídeos (Bray, 2004).

Previamente, acreditava-se que o tecido adiposo era metabolicamente inerte, contudo, evidências mostram que este tecido produz hormônios e mediadores inflamatórios capazes de produzir efeitos clínicos e subclínicos no organismo (Linder & Mueller, 2014). Mais do que um depósito de energia em excesso, é considerado um órgão endócrino dinâmico cuja função é alterada na obesidade (Raffan, 2013). O tecido adiposo secreta adipocinas, como a leptina e a adiponectina, que modulam muitos processos metabólicos (Ali Assad & Sood, 2012), tendo um papel importante na densidade mineral óssea (Oh *et al.*, 2005). Além disso, a hipertrofia de adipócitos leva a uma resposta inflamatória no tecido por meio do aumento da secreção de adipocinas e citocinas, além de promover um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda na circulação, levando a uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau (Osto & Lutz, 2015).

A obesidade deve ser considerada uma doença de preocupação à Saúde Única (Sandoe *et al.*, 2014), uma vez que é um problema crescente em todo o mundo (Tamashiro *et al.*, 2009), inclusive em animais de companhia, nos quais houve um crescimento mais dramático do que em humanos. Nestes animais, a relação social com humanos, a domesticação e o antropomorfismo parecem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da obesidade (Osto & Lutz, 2015).

Os métodos para identificação e avaliação da obesidade em animais e humanos são muitos, e incluem a mensuração da circunferência abdominal, a massa corporal, o índice de massa corporal (IMC), massa do tecido adiposo visceral, índice de adiposidade (IA),

histomorfometria do tecido adiposo (Daniels, 2006; Novelli *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2015), ultrassonografia (German, 2006; Okada *et al.*, 2017) e tomografia computadorizada. Esta última é considerada padrão ouro na avaliação da obesidade, entretanto a circunferência abdominal é uma ótima substituta (Doyle *et al.*, 2010). O IMC é um parâmetro amplamente utilizado para a identificação da obesidade em estudos, obtendo bons resultados; contudo, um estudo demonstrou ineficiência deste método em ratos em 72% dos indivíduos avaliados (Smith *et al.*, 2007).

Impacto social e econômico da obesidade

O problema da obesidade não se resume à natureza física da doença, mas também a graves problemas sociais e psicológicos, como depressão, estigmatização e suicídio (Sandoe *et al.*, 2014). Nos animais de companhia, apesar de os problemas relacionados à autoestima não se aplicarem (Sandoe *et al.*, 2014), problemas comportamentais dos tutores desempenham um papel importante no desenvolvimento da obesidade, como sobrealimentar, estimular ou observar o animal enquanto se alimenta, e a obesidade do próprio tutor (German, 2006). Em gatos, um estudo demonstrou que animais obesos aparentavam ter uma relação mais intensa com o tutor do que animais não obesos (Kienzle & Bergler, 2006) e que problemas de ansiedade nestes animais também parecem influenciar na obesidade (Heath, 2005).

Quanto ao impacto econômico, um estudo estimou que, em 2030, os gastos com a saúde em humanos obesos ou com sobrepeso poderia atingir de US\$860,7 bilhões a US\$956,9 bilhões (Wang *et al.*, 2008). Em relação aos animais de companhia, os tutores devem ser alertados quanto aos gastos associados a se ter animais obesos, o que inclui comida, cuidados veterinários, medicações e comorbidades (Linder & Mueller, 2014).

Alterações ortopédicas associadas à obesidade

Anteriormente, acreditava-se que a obesidade tinha um efeito estritamente positivo nos ossos devido ao estímulo mecânico do peso corpóreo na formação óssea (Cao, 2011; Scheller *et al.*, 2016). Contudo, atualmente reconhece-se a influência negativa do acúmulo tecido adiposo sobre os ossos (Bredella *et al.*, 2010). A relação patofisiológica entre a obesidade e o sistema musculoesquelético é complexa (Scheller *et al.*, 2016) e envolve uma gama de adipocinas e moléculas capazes de interferir na atividade das células envolvidas na regeneração osteocondral (Schewtz *et al.*, 2012).

Sabe-se que indivíduos obesos podem desenvolver problemas ortopédicos por diversos fatores, como por interferir no metabolismo osteoarticular (Schewtz *et al.*, 2012), pelo trauma associado à sobrecarga de peso sobre os músculos e ossos (Bray, 2004; Frye *et al.*, 2016) e por alterar o fluxo sanguíneo medular (Budzik *et al.*, 2017). A gordura visceral elevada pode também estar associada à redução dos níveis do hormônio de crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que são importantes para manutenção da homeostase óssea (Bredella *et al.*, 2010). Em humanos, este tipo de deposição adiposa tende a acontecer mais em homens, enquanto mulheres tendem a acumular mais gordura subcutânea na parte inferior do corpo (Osto & Lutz, 2015). Dentre os animais de companhia, os gatos parecem ter alta tendência a acumular gordura visceral (Okada *et al.*, 2017). Isto é importante porque a distribuição anatômica da gordura corporal, especialmente a gordura visceral intra-abdominal, tem um papel importante no desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade (German, 2006).

As células ósseas e as gordurosas advêm da mesma linhagem de células precursoras da medula óssea, capazes de se diferenciar em osteoblastos e adipócitos (Bredella *et al.*, 2010). Por isso, acredita-se que a obesidade possa promover a diferenciação destas células-tronco mesenquimais (CTMs) em adipócitos, reduzindo, portanto, as células disponíveis para diferenciação osteoblástica e formação óssea. Logo, seria esperado um efeito negativo na formação óssea (Cao, 2011).

Além disso, a obesidade está associada à inflamação crônica. O aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes pode promover atividade osteoclástica e reabsorção óssea por meio da modificação do receptor ativador de NF-kappa beta (RANK), RANK ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (Cao, 2011). Dentre as citocinas secretadas pelo tecido adiposo, a leptina é uma adipocina pró-inflamatória com efeito de aumento da adipogênese e redução da osteogênese por ativação da sinalização Jak2 / Stat3 nos ossos (Yue *et al.*, 2016). Ademais, a produção excessiva de leptina e/ou reduzida de adiponectinas pelos adipócitos na obesidade pode interferir diretamente na formação óssea ou indiretamente na reabsorção óssea. Por fim, a dieta hipercalórica pode interferir na absorção intestinal de cálcio e, por conseguinte, diminuir a disponibilidade deste para a formação óssea (Cao, 2011).

Quanto à susceptibilidade a fraturas em indivíduos obesos, anteriormente acreditava-se que um maior IMC era um fator protetivo ao esqueleto, estando relacionado a um menor risco de fraturas (Savvidis *et al.*, 2018). Contudo, estudos recentes questionaram essa noção, indicando que a obesidade está relacionada a um menor risco de certas fraturas, mas aumenta o

risco de outras (Compston *et al.*, 2011; Sabhaney *et al.*, 2014; Savvidis *et al.*, 2018), especialmente em extremidades (Taylor, 2006; Adams *et al.*, 2012; Backstrom *et al.*, 2012; Kessler *et al.*, 2012; Compston, 2013; Kim *et al.*, 2013). Outros estudos indicam ainda não haver diferença significativa entre indivíduos obesos e não obesos na ocorrência de fraturas (Doan, *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2013; Sabhaney *et al.*, 2014). Em metanálise conduzida por Ho-Pham *et al.* (2014), a relação entre maior massa corporal e maior densidade óssea foi mais evidente no grupo com maior massa magra do que no grupo com maior massa gorda. Sabe-se que indivíduos obesos tem um aumento predominante de massa gorda, mas ocorre concomitantemente um aumento da massa magra, e pode ser que isso contribua para os efeitos positivos do sobrepeso sobre a densidade mineral e a microarquitetura óssea (Madeira *et al.*, 2014; López-Gómez *et al.*, 2016).

Várias afecções osteomusculares já foram associadas à obesidade, como a osteoartrite (Raffan, 2013; Sandoe *et al.*, 2014), displasia coxofemoral (Marshall *et al.*, 2009), doença articular degenerativa (Iannone & Lapadula, 2010; Gruen *et al.*, 2017) e doença do disco intervertebral (Frye *et al.*, 2016). Sabe-se que esta associação não está influenciada somente pelos efeitos mecânicos da obesidade, mas também por seus efeitos sistêmicos. Por exemplo, a ocorrência de osteoartrite é significativamente maior em indivíduos obesos (Bray, 2004), e os efeitos mecânicos da sobrecarga de peso sobre as articulações podem, sim, causar ou agravar a osteoartrite (Raffan, 2013); contudo, é interessante observar que, em humanos, não são apenas as articulações que suportam o peso corpóreo que desenvolvem a osteoartrite. Isto sugere que os efeitos mecânicos do sobrepeso não são os únicos fatores predisponentes à afecção, e que componentes decorrentes da obesidade alterem a cartilagem e o metabolismo ósseo (Bray, 2004), possivelmente devido à ação das citocinas pró-inflamatórias (Raffan, 2013). Vale ressaltar que, além da obesidade predispor a osteoartrite, é possível que a osteoartrite promova o desenvolvimento da obesidade por restringir a movimentação do indivíduo acometido (Sandoe *et al.*, 2014).

As alterações ósseas decorrentes da obesidade são graves e podem prevalecer mesmo após a perda de peso (Scheller *et al.*, 2016).

Impacto social e econômico das alterações osteomusculares

Problemas osteomusculares e articulares degenerativos ou inflamatórios afetam milhões de pessoas ao redor do mundo, que sofrem de dor crônica e muitas vezes se tornam fisicamente debilitadas ou incapacitadas. Estes indivíduos são impactados economicamente de forma direta,

por meio de gastos médicos, e indireta, por redução da produtividade laboral; e psicologicamente, desenvolvendo ansiedade e depressão, e sofrendo redução da qualidade de vida (Planell, 2009).

Desordens do sistema musculoesquelético são também comuns em medicina veterinária (Riegel & Godbold Jr., 2017; Mocchi *et al.*, 2020), afetando 24% dos cães (Johnson *et al.*, 1994), assim como gatos (Shearer, 2017). Estes problemas geram gastos aos tutores, tanto com cuidados veterinários, quanto com manejo ambiental para controle da dor e para minimizar as limitações funcionais do animal (Riegel & Godbold Jr., 2017).

Anatomia e histologia óssea

A anatomia de ossos longos consiste em duas extremidades denominadas epífises, um corpo longo denominado diáfise, e duas zonas de transição entre as epífises e a diáfise, denominadas metáfises. A diáfise é um cilindro de parede espessa que contém em seu interior a medula óssea, onde estão localizadas as células hematopoiéticas (Reece, 2017) e uma população de células-tronco mesenquimais (Marx & Garg, 1998). A camada mais externa do osso é denominada cortical, que é formada por tecido ósseo compacto, também conhecido como tecido ósseo osteônico. Nos ossos longos, este tecido corresponde a 80% do osso; os 20% remanescentes correspondem ao tecido ósseo esponjoso, também conhecido como trabecular (Vernon *et al.*, 2012), que se encontra majoritariamente nas epífises ósseas (König & Liebich, 2011). O tecido ósseo osteônico é formado por matriz extracelular intensamente mineralizada organizada em lamelas concêntricas circundando o canal Haversiano (Marx & Garg, 1998; Fiore, 2001), sendo um tecido altamente vascularizado (Cormack, 2003). O tecido ósseo trabecular é formado por uma rede de trabéculas interconectadas e espaços intertrabeculares (Ben-Zvi *et al.*, 2017). A superfície do osso é recoberta por perióstio, que é um tecido conjuntivo especializado formado por duas camadas: a mais externa (fibrilar), composta por fibras colágenas densas e fibroblastos, sendo rica em nervos e vasos; e a mais interna (celular ou *cambium*), composta por células osteoprogenitoras, contendo osteoblastos funcionais (Marx & Garg, 1998).

O osso pode ser considerado um órgão multifuncional que promove estrutura, proteção (Vernon *et al.*, 2012), hematopoiese e regulação da homeostase mineral (Morgan *et al.*, 2010), além de diversas funções endócrinas (Karsenty & Ferron, 2012; Karsenty & Oury, 2014). Os principais tipos celulares que compõem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Reece, 2017). Estas células são intimamente relacionadas e derivam da mesma

linhagem de células precursoras (Marx & Garg, 1998). Os osteoblastos são responsáveis pelo processo da osteogênese (Cormack, 2003) e localizam-se na medula óssea e na camada celular do periósteo (Marx & Garg, 1998). Após o amadurecimento, os osteoblastos podem entrar em apoptose ou se diferenciar em osteócitos (Dallas & Bonewald, 2010). Os osteócitos são as células ósseas mais abundantes (Rocheffort *et al.*, 2010) e representam o estágio final da maturação da linhagem de células do tecido ósseo (Cormack, 2003). São circundados por um sistema de ductos, chamados canalículos, que são prolongamentos citoplasmáticos intercomunicantes (Cormack, 2003; Rocheffort *et al.*, 2010) que permitem trocas metabólicas e bioquímicas entre estas células e a corrente sanguínea (Marx & Garg, 1998). Isto é importante pois os osteócitos são responsáveis pelo metabolismo de cálcio e fósforo (Dallas & Bonewald, 2010). Os osteoclastos são grandes células multinucleadas, formadas a partir de monócitos, localizadas nas lacunas de Howship ao longo da matriz mineralizada, e são responsáveis pela reabsorção de matriz óssea excedente ou de qualidade inferior, sendo essenciais no processo de remodelação e reparo ósseo (Marx & Garg, 1998; Cormack, 2003).

Os componentes extracelulares do tecido ósseo são mineralizados, promovendo rigidez e proporcionando suporte mecânico (Planell, 2009). A matriz óssea é capaz de suportar dobramentos, distensões, compressões e torções, pois, além de ser composta por sais de cálcio insolúveis, é rica em fibras colágenas, especialmente do tipo I, tornando-a muito resistente a forças tênses (Cormack, 2003). Além disso, a matriz possui um pequeno conteúdo proteoglicano e outros componentes orgânicos como glicosaminoglicanos, glicoproteínas, osteonectina, osteocalcina e outras proteínas de matriz que induzem a formação óssea. A composição mineral da matriz é predominantemente de cristais de hidroxiapatita (Roach, 1994; Robey, 2008). Esta composição mineralizada da matriz óssea não permite o corte histológico, tornando-se necessário um processo de descalcificação, o que deteriora a aparência do osteócito, restando apenas seu núcleo e eventuais remanescentes retraídos no citoplasma (Cormack, 2003).

Reparação óssea

O tecido ósseo possui capacidade de reparar e regenerar fraturas, assim como de se manter um órgão ativo e altamente dinâmico, continuamente se remodelando durante a vida adulta (Majidinia *et al.*, 2017; Adamopoulos, 2018). O osso é um tecido com alto potencial de regeneração, podendo se recuperar completamente quando em ambiente ideal, sem formar

cicatrizes fibrosas e reestabelecendo função indistinguível à que precedeu a lesão (Loi *et al.*, 2016).

O processo da reparação óssea necessita da ação conjunta de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, e fatores pró-osteogênicos e pró-angiogênicos (Schindeler *et al.*, 2008; Loi *et al.*, 2016), restaurando os danos e preservando a homeostasia (Adamopoulous, 2018). As redes vasculares ósseas têm capacidade de adaptação quando há o rompimento da circulação óssea, contribuindo nos processos de reparação (McCarthy, 2006). A lei de Wolff é outro fator que participa do processo de remodelação e reparação óssea (Planell, 2009). Esta lei foi descrita pela primeira vez por Wolff (1892) e define que o osso se adapta à influência mecânica de seu meio, ou seja, o osso tende a se remodelar de acordo com os efeitos mecânicos aos quais é submetido. O efeito piezoelétrico consiste na característica do tecido ósseo de produzir sinais elétricos quando sob estresse mecânico (Fukada & Yasuda, 1957; Shamos *et al.*, 1963), e dessa forma também promove crescimento e remodelação óssea (Cerroloza *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2017).

A reparação óssea pode ocorrer de forma direta (primária) ou indireta (secundária) (Schindeler *et al.*, 2008). A reparação primária se assemelha ao processo normal de remodelação óssea, e ocorre quando há fixação rígida da fratura, com contato direto e compressão entre os fragmentos (Loi *et al.*, 2016), e *strain* inferior a 2% (Ghimire *et al.*, 2021). Esta reparação caracteriza-se pela deposição direta de tecido ósseo, sem haver formação de calo intermediário (Perren, 2002; Schindeler *et al.*, 2008), ocorrendo reabsorção óssea por osteoclastos e deposição de matriz óssea por osteoblastos, reestabelecendo o sistema Harversiano (McKibbin, 1978; Loi *et al.*, 2016). Mais detalhadamente, neste tipo de reparação óssea, primeiramente o espaço da lesão é ocupado por tecido de granulação (Vernon *et al.*, 2012). Em seguida, na presença de fatores osteogênicos (Schindeler *et al.*, 2008), as CTMs se diferenciam unicamente em linhagem osteoblástica, não ocorrendo fase condrogênica (Behonick *et al.*, 2007). Os osteoblastos maduros, então, sintetizam osteoides, os quais sofrem mineralização, formando trabéculas ósseas, isto é, matriz óssea neoformada (Cashman & Ginty, 2003), também conhecida como *woven bone* ou osso imaturo (Hernandez *et al.*, 2004; Loi *et al.*, 2016). Este tipo de osso está presente na osteogênese embrionária e na reparação de fraturas, se formando rapidamente e diferindo do tecido ósseo lamelar por apresentar matriz extracelular irregular e aparentar ter um número de osteócitos de quatro a oito vezes maior (Hernandez *et al.*, 2004). Este tecido é progressivamente substituído por tecido ósseo lamelar durante a fase

de remodelação óssea (Vernon *et al.*, 2012), enfim, assumindo forma semelhante à que precedeu a lesão (Loi *et al.*, 2016).

Já a reparação secundária ou indireta ocorre em estágios que, de forma geral, são: 1) inflamatório, no qual há formação de coágulo, ação de macrófagos e formação de tecido de granulação; 2) de reparação, no qual há formação de calo fibrocartilaginoso e ósseo, ocorrendo a osteogênese; e 3) de remodelação, no qual o calo é remodelado em configuração cortical e/ou trabecular, retornando à apresentação semelhante à original (Schindeler *et al.*, 2008). Este é o tipo de reparação mais frequente, uma vez que na maioria das fraturas não se consegue estabilidade completa, havendo maior mobilidade no sítio da fratura (Loi *et al.*, 2016).

O primeiro estágio da reparação indireta, conhecido como estágio inflamatório, consiste no desencadeamento da cascata de reparação após a injúria (Schindeler *et al.*, 2008). Devido à ruptura da vasculatura local, há formação do hematoma (Schindeler *et al.*, 2008) e de uma rede de fibrina provisória, que cria uma matriz que permite o influxo de células inflamatórias no local da lesão (Loi *et al.*, 2016) – como neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos (Vernon *et al.*, 2012) – atraídas pela ativação de fatores de reparação não específicos, como fatores derivados de plaquetas e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Loi *et al.*, 2016). A matriz provisória e as células necróticas são fagocitadas e ocorre liberação de mediadores quimiotáticos e inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), que atraem células-tronco mesenquimais (CTMs) e células osteoprogenitoras ao sítio da lesão (Kon *et al.*, 2001; Bielby *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013). O hematoma é eliminado, ocorre a formação de capilares e de tecido de granulação (Schindeler *et al.*, 2008), e a reação inflamatória se cessa dentro de uma semana (Loi *et al.*, 2016). Macrófagos, células gigantes e outras células fagocíticas fazem a remoção de células degeneradas e debris (Schindeler *et al.*, 2008).

No segundo estágio da reparação indireta, conhecido como estágio de reparação, ocorre diferenciação das CTMs em condrócitos, que formarão o calo fibrocartilaginoso (Bielby *et al.*, 2007), que substituirá todo o tecido de granulação (Schindeler *et al.*, 2008). Este calo promove estabilidade mecânica e serve como base para a ossificação endocondral (Loi *et al.*, 2016). O calo fibrocartilaginoso é majoritariamente avascular, mas, após a ação de fatores de crescimento e fatores pró-angiogênicos, ocorre a invasão deste tecido por células endoteliais (Schindeler *et al.*, 2008). Este processo dá início à osteogênese, havendo diferenciação de CTMs e células osteoprogenitoras do periósteo em osteoblastos que sintetizam o tecido ósseo neoformado, promovendo a ossificação do calo (Loi *et al.*, 2016), e formando uma estrutura desorganizada

chamada de calo ósseo (Vernon *et al.*, 2012). Esta formação óssea tipicamente se inicia na camada celular do perióstio, próximo ao ponto da lesão, e avança até a fratura (Rana *et al.*, 2009). Com o avanço desta fase dá-se início ao último estágio da reparação óssea.

O terceiro e último estágio da reparação óssea indireta, conhecido como estágio de remodelação, ocorre quando o calo ósseo e os resquícios de matriz cartilaginosa são removidos por ação osteoclástica (Loi *et al.*, 2016) e o tecido ósseo neoformado é convertido em osso lamelar, formado por camadas paralelas de fibras colágenas (Vernon *et al.*, 2012), retornando à configuração osteônica/trabecular inicial (Schindeler *et al.*, 2008). Nesta fase, duas citocinas são de extrema importância para a indução da ação osteoclástica: M-CSF e RANK-L, que induzem as células-tronco hematopoiéticas a se diferenciarem em osteoclastos, e coordenam a formação e reabsorção óssea, respectivamente (Lopes *et al.*, 2018). Esta reestruturação ocorre em resposta aos efeitos da mecanotransdução sobre os osteócitos, osteoclastos e osteoblastos (Frost, 2001; Planell, 2009; Vernon *et al.*, 2012).

Teste de flexão em três pontos

O teste de flexão em três pontos é o método de flexão óssea mais comumente utilizado, sendo tipicamente aplicado a ossos longos de roedores (Beaupied *et al.*, 2007). Este teste permite a análise quantitativa da qualidade biomecânica óssea, determinando sua resistência e possuindo alta sensibilidade (Leppänen *et al.*, 2008; Ayagara *et al.*, 2019). A força máxima consiste no máximo de carga que o osso suporta antes de fraturar (Forestier-Zhang & Bishop, 2015). A deformação até falha é o máximo de deformação que o osso suporta antes de fraturar (Forestier-Zhang & Bishop, 2015). Este valor decresce quando há maior mineralização óssea, tornando o osso menos dúctil, ou seja, com menor capacidade de deformação sem fraturar; contudo, a mineralização óssea ideal promove proporções ideais de rigidez e fragilidade (Turner, 2002). O módulo de elasticidade é a resistência à deformação óssea. Este teste é reversível, uma vez que o osso volta a sua forma original quando a carga é removida, e está altamente relacionado à mineralização da matriz extracelular e ao colágeno, tornando o osso mais resistente à deformação elástica e aumentando o valor do módulo de elasticidade (Forestier-Zhang & Bishop, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O experimento foi conduzido conforme as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA), sob aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade de Uberaba, com o protocolo de número 027/2019 (anexo I).

Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar, com idade média de dois meses e peso médio inicial aproximado de 220 g. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia e possuíam atestado de estarem livres de patógenos.

Manejo dos animais

Os animais foram mantidos no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba, alojados em caixas com quatro animais cada, sob condições de umidade e temperatura controladas e fotoperíodo de 12 horas. As caixas tinham 41 cm de comprimentos, 34 cm de largura e 18 cm de altura, e eram lavadas e preenchidas com maravalha limpa em dias alternados. Para identificação, cada rato foi marcado na cauda com anéis desenhados de caneta tipo *brush*. Por um período de adaptação de 15 dias, a alimentação consistiu em ração comercial para roedores (Labina, Presence[®], Brasil) e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo obeso (n=30) que recebeu dieta experimental hipercalórica rica em carboidratos simples (Lacerda *et al.*, 2015) e grupo não obeso (n=30), que recebeu dieta comercial controlada (Labina, Presence[®], Brasil) (Neves *et al.*, 2013), ambos por 60 dias. Cada grupo foi, então, dividido em quatro tempos de avaliação após a ostectomia monocortical proximal de tíbia, e um grupo controle não submetido à lesão óssea, da seguinte forma: D3 (n=6), D7 (n=6), D19 (n=6), D28 (n=6) e controle / sem lesão óssea (n=6) (figura 1).

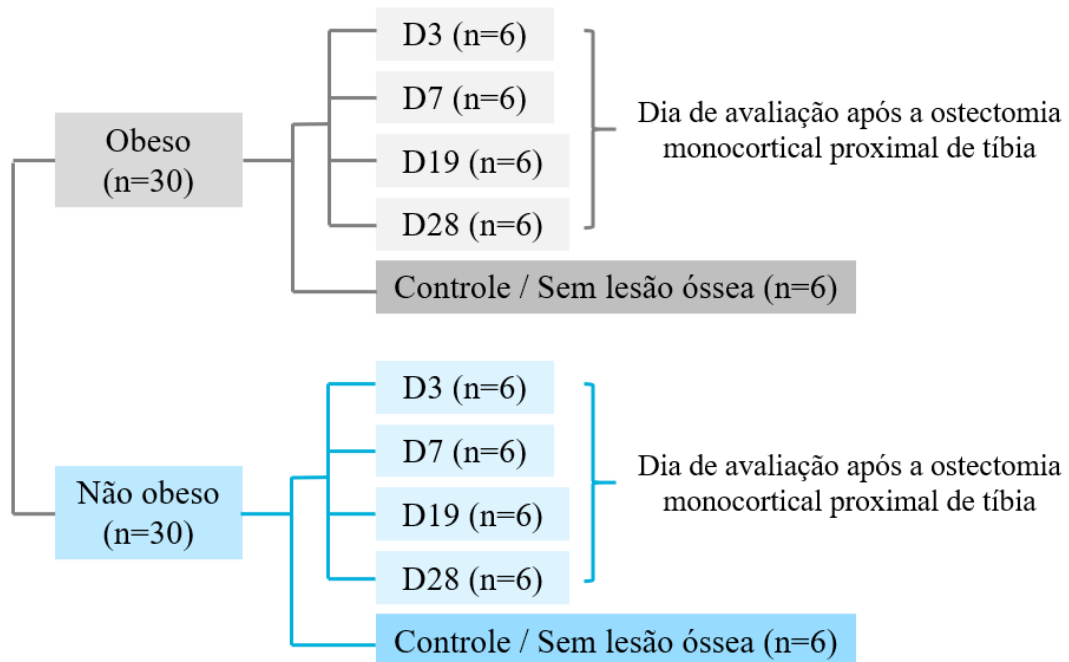


Figura 1. Imagem ilustrativa da divisão dos grupos obeso (n=30) e não obeso (n=30), cada um em quatro tempos de avaliação, dia três (D3), dia sete (D7), dia 19 (D19) e dia 28 (D28), que correspondem aos dias após a indução da lesão óssea para os animais submetidos à osteotomia monocortical proximal de tibia (três, sete, 19 e 28), e um grupo controle não submetido à lesão óssea, configurando seis animais por grupo, para estudo da influência da obesidade na reparação óssea.

Dietas

Os animais do grupo não obeso receberam ração comercial balanceada (Labina, Presence[®], Brasil) em porções de aproximadamente 20 g por rato por dia (Neves *et al.*, 2013). Esta ração padrão tem composição estimada de 3,59 kcal/g, 54,63% de carboidratos, 5,21% de lipídeos, 23,85% de proteínas, 7,94% de cinzas, 8,60% de umidade, 6,23% de fibras, 37,04 g/100g de sacarose, 1,4% de cálcio e 1,04% de fósforo (Barcellos, 2012).

Para indução da obesidade nos animais do grupo obeso, foi utilizada a dieta hipercalórica rica em carboidratos simples (Lacerda *et al.*, 2015). Esta dieta experimental era composta por ração comercial triturada (Labina, Presence[®], Brasil), leite condensado (Moça, Nestlé[®], Brasil), açúcar refinado (União, Nestlé[®], Brasil) e água, nas proporções descritas no quadro 1, e era fornecida em porções de aproximadamente 37,5 g por rato.

Quadro 1. Composição centesimal da dieta experimental hipercalórica rica em carboidratos simples utilizada para indução da obesidade em ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar submetidos ou não à ostectomia monocortical proximal de tibia para estudo da influência da obesidade na reparação óssea.

Ingredientes	Quantidade (%)
Leite condensando	40,00
Ração comercial triturada	40,00
Açúcar refinado	11,00
Água	9,00
Total	100,00

A ração comercial foi triturada em processador de alimentos (Skymesen PA-7, Skymesen[®], Brasil) e misturada aos demais ingredientes, todos pesados em balança de precisão de 0,5 g (C&F P-15, C&F Comércio e Serviços Eireli[®], Brasil), formando porções e distribuindo-as. A dieta foi preparada diariamente no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba segundo o protocolo no Anexo II.

Esta dieta tem composição estimada de 3,23 kcal/g, 54,69% carboidratos, 5,71% de lipídeos, 13,27% de proteínas, 4,01% de cinzas, 22,30% de umidade, 3,47% de fibras, 48,40 g/100g de sacarose, 1,0% de cálcio e 0,63% de fósforo (Barcellos, 2012).

Monitoramento do ganho de massa corporal

Os animais foram pesados semanalmente, sendo feita, também, a mensuração da circunferência abdominal e do comprimento nasoanal de cada rato, permitindo o cálculo de índice de massa corporal (IMC) por meio da razão entre a massa corporal do animal em gramas e o comprimento nasoanal em centímetros ao quadrado (Novelli *et al.*, 2007).

$$\text{IMC} = \frac{\text{massa corporal (g)}}{\text{comprimento nasoanal}^2 (\text{cm}^2)} \quad (1)$$

Para realização da pesagem, era colocado um recipiente de polipropileno na balança, desconsiderando-se sua massa por meio da função “tarar”, e colocava-se um rato por vez em seu interior, obtendo-se, assim, a massa corporal de cada animal. Para a mensuração da circunferência abdominal e do comprimento nasoanal utilizou-se, respectivamente, uma fita

métrica na maior circunferência do abdômen, apoiando o animal sobre os membros pélvicos; e no dorso do animal, do ponto mais cranial do focinho até o ânus, com o animal em posição de estação (figura 2).

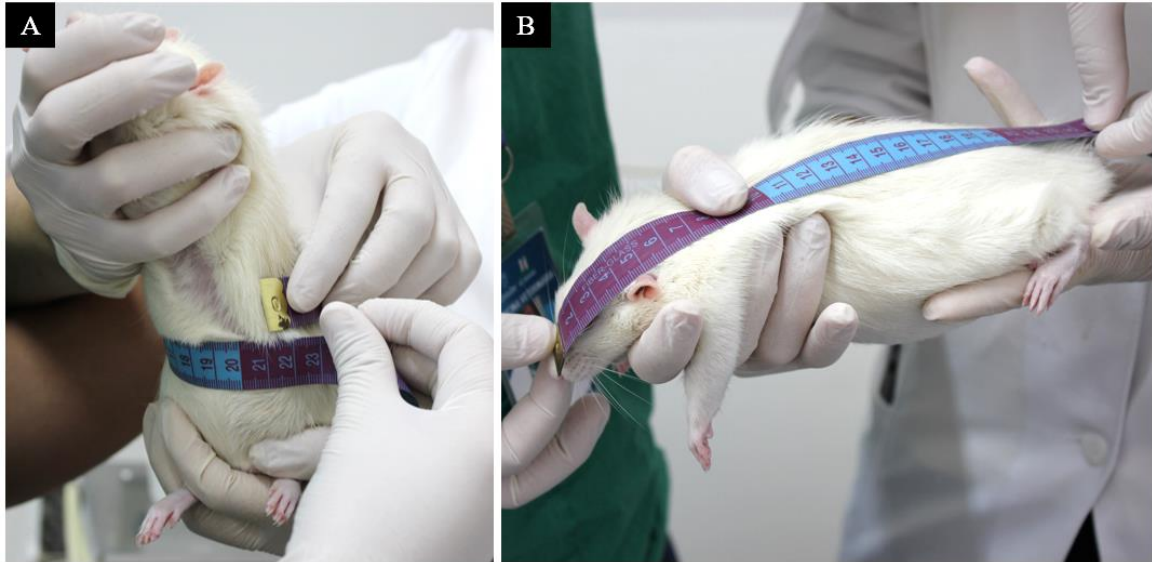


Figura 2. Imagem ilustrativa da mensuração da circunferência abdominal (A) e do comprimento nasoanal (B) de rato (*Rattus norvegicus*) macho de linhagem Wistar para estudo da influência da obesidade na reparação óssea.

Estes cálculos foram utilizados como critério para seleção dos animais para o início do estudo, sendo que os animais que pontuavam entre 0,45 e 0,68 g/cm² no IMC eram considerados não obesos, e acima de 0,68 g/cm² eram considerados obesos e, portanto, aptos para o início do estudo (Novelli *et al.*, 2007). Vale ressaltar que o estudo foi conduzido com os animais já em fase adulta, com aproximadamente quatro meses de idade.

Técnica anestésica e profilaxia antimicrobiana

Após um período de jejum alimentar e hídrico de 12 horas, os animais foram anestesiados para a realização do procedimento cirúrgico utilizando-se o seguinte protocolo: medicação pré-anestésica com morfina (Dimorf, sulfato de morfina 10mg/mL, Cristália[®], Itapira, SP, Brasil) na dose de 4 mg/kg por via subcutânea (SC) e cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec[®], Brasil) na dose de 70 mg/kg e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec[®], Brasil) na dose de 4 mg/kg por via intraperitoneal (IP) para a indução anestésica, fazendo-se a antisepsia no local de aplicação com algodão embebido em álcool 70%. Os animais foram considerados em plano anestésico adequado para a cirurgia quando não mais respondessem ao reflexo de retirada por estímulo doloroso pela pressão das falanges distais dos membros

pélvicos. Foi feita, então, a aplicação SC de enrofloxacina 10% (Kinetomax, Bayer[®], Brasil) na dose de 10 mg/kg por via SC como forma de profilaxia antimicrobiana.

Antissepsia e preparação do campo operatório

Foi realizada tricotomia ampla e a antissepsia de ambos os membros pélvicos do animal com gaze estéril embebida em solução degermante de clorexidina 2% (Riohex, Rioquímica[®], Brasil) e solução alcoólica de clorexidina a 0,5% (Riohex, Rioquímica[®], Brasil), aplicando-se três vezes cada antisséptico intercaladamente.

Defeito ósseo monocortical proximal da tíbia

A cirurgia foi realizada respeitando as regras de assepsia. O rato foi acomodado em decúbito dorsal na bancada cirúrgica sobre uma bolsa de água morna para manutenção da temperatura corporal, e seus membros pélvicos foram isolados com pano de campo cirúrgico estéril.

Para o acesso cirúrgico foi realizada uma incisão longitudinal craniomedial na pele de aproximadamente 1,5 cm na porção proximal da tíbia. O tecido subcutâneo foi divulsionado e a porção proximal da tíbia foi exposta (figura 3-A). Fez-se o bloqueio anestésico local instilando-se bupivacaína (Neocaína 0,5%, Cristália[®], Itapira, SP, Brasil) diluída a 10% em solução fisiológica estéril na ferida cirúrgica para a realização do defeito ósseo. Com o auxílio de uma furadeira autoclavável com rotação controlada e uma broca de 2 mm de diâmetro foi criado um defeito ósseo monocortical na face medial da porção proximal da tíbia, a cerca de 8 mm da articulação femorotibiopatelar (figura 3-B). Em seguida, o defeito foi lavado com solução salina estéril sob pressão moderada para remoção de partículas ósseas (figura 3-C e D). O tecido subcutâneo e o espaço morto foram reduzidos em planos de sutura simples contínua, e a pele foi aproximada em padrão subcuticular, todos com fio de poliamida 4-0 (mononilon 4-0, Ethicon[®], Brasil) (figura 3-E). O mesmo procedimento foi realizado no membro contralateral. Este processo ocorreu na sala de cirurgia do Biotério Central da Universidade de Uberaba.

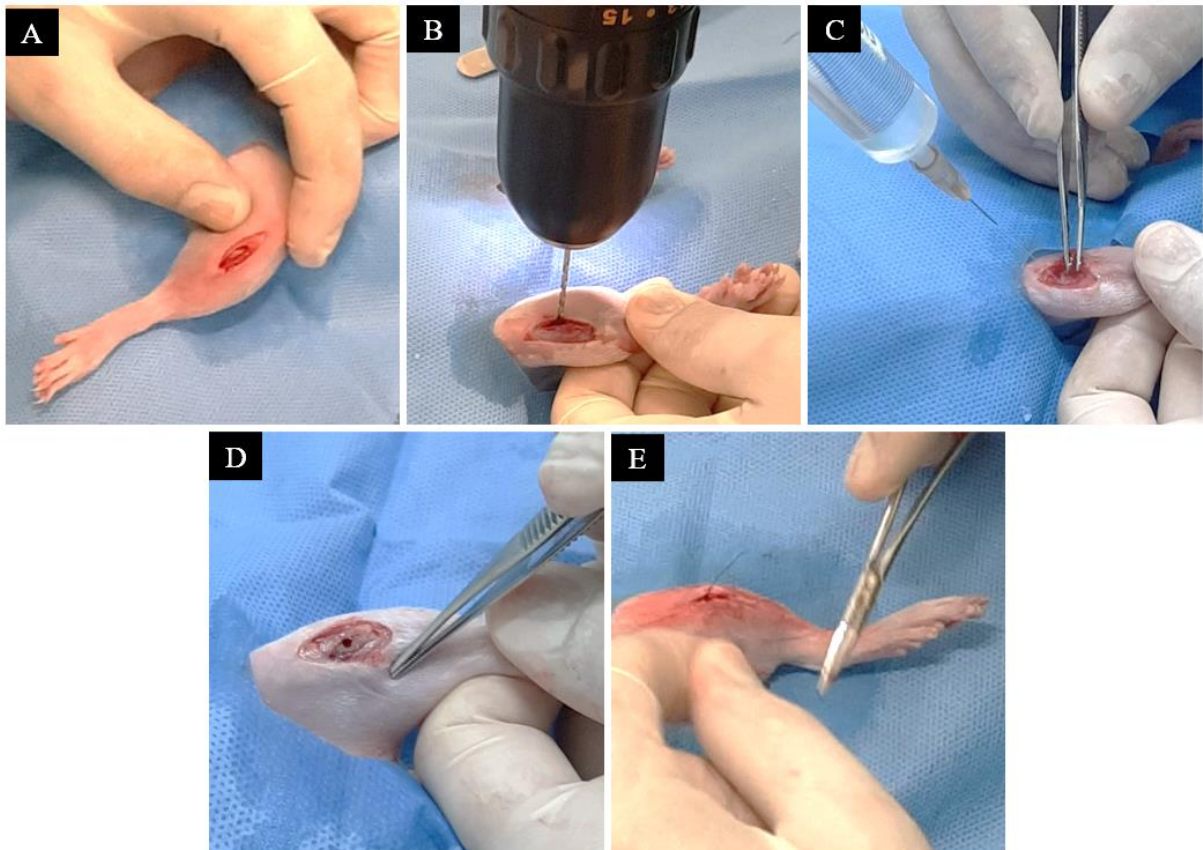


Figura 3. Imagem ilustrativa de procedimento cirúrgico de osteotomia monocortical proximal de tibia para estudo da influência da obesidade na reparação óssea em rato (*Rattus norvegicus*) macho de linhagem Wistar. (A) Pele incisionada e subcutâneo divulsionado. (B) Realização de osteotomia monocortical proximal de tibia com furadeira autoclavável de rotação controlada e broca de 2 mm. (C) Remoção de partículas ósseas com solução salina estéril sob pressão moderada. (D) Defeito ósseo monocortical proximal de tibia. (E) Síntese com fio de poliamida 4-0.

Pós-operatório imediato e mediato

Logo após a cirurgia, foi feita a limpeza e antissepsia das feridas cirúrgicas com solução alcoólica de clorexidina a 0,5% (Riohex, Rioquímica[®], Brasil). O animal seguiu para a sala de recuperação anestésica, onde foi alojado em caixa de polipropileno forrada de maravalha limpa e com bolsas de água morna para manutenção da temperatura, sendo monitorado até sua completa recuperação anestésica. Foi, então, realizada analgesia com cloridrato de tramadol (Tramadol, Cristália[®], Itapira, SP, Brasil) 2 mg/kg SC e repetida após 12 horas.

Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Os tempos de eutanásia ocorreram nos dias três, sete, 19 e 28 de pós-operatório nos animais obesos e não obesos submetidos à osteotomia monocortical proximal de tibia e, nos animais sem lesão óssea, a eutanásia ocorreu juntamente com os ratos avaliados no dia sete. Executou-se a sobredose anestésica de cetamina (Cetamin, Syntec[®], Brasil), 180 mg/kg, e

xilazina (Xilazin, Syntec[®], Brasil), 30 mg/kg, ambas por via IP. Tomaram-se as medidas de massa corporal, circunferência abdominal e comprimento nasoanal. Constatando-se não haver sensibilidade dolorosa e reflexo de retirada pela pressão das falanges distais dos membros pélvicos, foi realizada uma incisão ampla em região abdominal, localizando-se a veia cava, e feita a venopunção até o choque hipovolêmico.

Em seguida, foram coletadas as gorduras retroperitoneal (RTP), mesentérica (MST) e perigonadais (PGN), que foram lavadas em solução fisiológica estéril e pesadas individualmente em balança de precisão de 0,005 g (Gehaka BK600, Gehaka[®], Brasil), para cálculo da massa do tecido adiposo visceral por meio da somatória das massas e do índice de adiposidade. A tíbia esquerda foi coletada juntamente ao tecido de reparação formado no foco de lesão e fixada em formalina tamponada a 10% por 48 horas e depois em álcool 70%, para análise histológica e histomorfométrica. A tíbia direita foi coletada, pesada em balança de precisão de 0,005 g (Gehaka BK600, Gehaka[®], Brasil), envolta em gaze embebida em solução salina estéril e congelada a -20 °C para posterior realização de teste de flexão em três pontos e avaliação da composição óssea.

Índice de adiposidade

O índice de adiposidade (IA) foi definido a partir da somatória das massas de cada uma das gorduras coletadas na eutanásia dividida pelo valor da massa corporal do rato no dia da eutanásia.

$$\text{IA} = \frac{\text{RTP} + \text{PGN} + \text{MST (g)}}{\text{massa corporal (g)}} \quad (2)$$

Teste de flexão em três pontos

As tíbias direitas, previamente congeladas à -20 °C, foram descongeladas por imersão em água em temperatura ambiente por duas horas. Com um paquímetro digital, tomou-se as medidas da largura e espessura do foco da lesão nas tíbias submetidas à ostectomia monocortical proximal, e a 8 mm da articulação femorotibiopatelar nos animais sem lesão óssea, para configuração da máquina universal de ensaios (EMIC DL-3000, EMIC[®], Brasil) para obtenção dos valores de força máxima e de deformação até a falha.

Em seguida, os ossos foram posicionados individualmente em máquina universal de ensaios (EMIC DL-3000, Instron®, Brasil), com a lesão voltada para baixo, e programação em velocidade de 2 mm/minuto, distância de apoio de 20 mm e pré-carga de 20 g, a fim de se encontrar os valores de força máxima, deformação até a falha e módulo de elasticidade (figura 4).

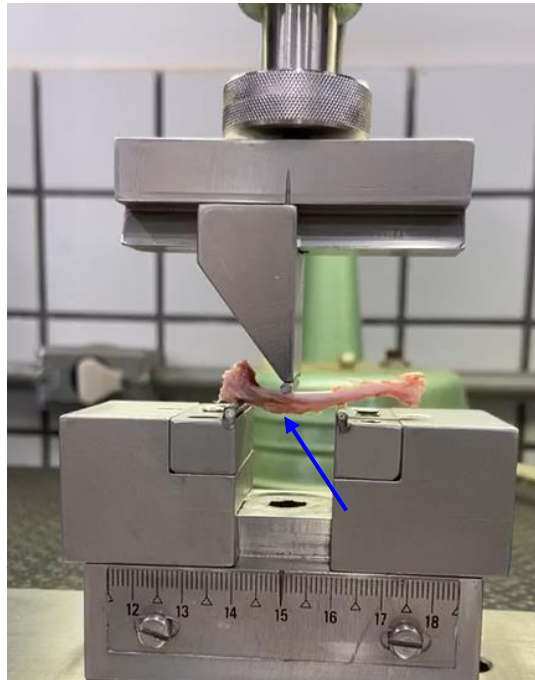


Figura 4. Imagem ilustrativa do teste de flexão em três pontos em tíbia submetida à osteotomia monocortical proximal em máquina universal de ensaios, com a lesão voltada para baixo (seta azul), e programação em velocidade de 2 mm/minuto, distância de apoio de 20 mm e pré-carga de 20 g, a fim de se encontrar os valores de força máxima e de deformação até a falha para estudo da influência da obesidade na reparação óssea em ratos (*Rattus norvegicus*) machos de linhagem Wistar.

O módulo de elasticidade foi calculado por meio da divisão do valor da força máxima pelo valor da deformação até a falha (Callister, 2012). Os valores obtidos foram discurridos em arquivo Excel. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Materiais da Universidade de Uberaba. Após estes processos, as tíbias foram novamente congeladas a -20 °C para posterior avaliação da composição óssea.

$$\text{módulo de elasticidade} = \frac{\text{força máxima (N)}}{\text{deformação até falha } (\mu\text{m})} \quad (3)$$

Preparo das amostras ósseas para histologia e histomorfometria

Descalcificação óssea com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%

Para a descalcificação óssea, as tíbias esquerdas, anteriormente fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas e depois em solução de álcool 70%, foram envoltas em gaze e submersas em solução de etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tetrassódico a 10% (pH 7,4), sendo penduradas por barbantes identificados, de modo que toda a sua superfície estivesse em contato com a solução, possibilitando descalcificação uniforme. Foram, então, mantidas em geladeira à temperatura de 4°C. Esta solução foi preparada segundo o protocolo descrito no anexo III. Por um período de 90 dias, a solução de EDTA foi trocada em dias alternados até que o osso atingisse descalcificação ideal para a confecção das lâminas histológicas. Após este período, os ossos foram imersos em solução PBS 0,15 molar, preparada segundo os protocolos descritos nos anexos IV e V, onde foram mantidos até o momento da inclusão em parafina.

Preparo das lâminas histológicas para análises histomorfológica e histomorfométrica das tíbias

Os ossos previamente descalcificados foram avaliados individual e macroscopicamente para localização da lesão óssea monocortical proximal, e cortados transversalmente na extremidade proximal da lesão. Para os ossos não submetidos à lesão, realizou-se corte transversal a 8 mm da articulação femorotibiopatelar. Os cortes foram armazenados em cassetes histológicos imersos em PBS, e posteriormente processados de acordo com a técnica rotineira, como descrito no anexo VI, para inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo os cortes de tíbia foram seccionados transversalmente à lesão em micrótopo (RM2145, Leica Biosystems®, Estados Unidos) em sessões histológicas de 5 µm, que foram colocadas em lâminas histológicas comuns e submetidas à coloração em hematoxilina e eosina (anexo VII). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Histopatologia da Universidade de Uberaba.

Análises histomorfológica e histomorfométrica das tíbias

A análise histomorfométrica consistiu na avaliação individual das lâminas, que foram escaneadas em *scanner* de lâminas (Aperio Scanscope AT, Leica Biosystems®, Alemanha) na Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia e avaliadas em aumento de 70 vezes em programa Image J, mensurando-se a área do tecido ósseo em µm²

utilizando-se a ferramenta “*polygon selections*”, e quantificando os osteócitos utilizando-se a ferramenta “*multi-point*”, ambos em seis campos de avaliação. A análise histológica das lâminas consistiu na avaliação descritiva do processo de reparação em aumento de 200 vezes em programa Aperio ImageScope 12.1.

Avaliação da composição óssea

Massa óssea

As tíbias direitas foram individualmente pesadas em balança de precisão de 0,005 g (Gehaka BK600, Gehaka[®], Brasil) no momento da eutanásia para obtenção da massa óssea.

Massa óssea orgânica

As tíbias direitas foram, então, colocadas em crisóis de porcelana identificados por um período de 24 horas em estufa de secagem (NI-1510D, Novainstruments[®], Brasil) a 100°C para eliminação da umidade. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Química da Universidade de Uberaba. Os ossos foram pesados novamente ao final do processo. O valor obtido nesta pesagem foi utilizado posteriormente para obtenção do valor da massa óssea orgânica por meio da subtração da massa obtida neste processo (massa seca) pela massa óssea mineral (anexo VIII), obtida no processo descrito a seguir.

$$\text{massa óssea orgânica} = \text{massa seca (g)} - \text{massa óssea mineral (g)} \quad (4)$$

Massa óssea mineral

Em seguida, as amostras foram levadas para forno mufla (Q318M, Quimis[®], Brasil) a 800 °C por um período de 24 horas a fim de eliminar toda a matéria orgânica, sendo pesadas ao final do processo para obtenção da massa óssea mineral (anexo VIII). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Química da Universidade de Uberaba.

Análise estatística

Realizou-se a análise estatística pelo programa GraphPad Prism 9.0 e para cada variável determinou-se a média e desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados que tiveram distribuição

paramétrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste T pareado, quando comparado um mesmo grupo em períodos diferentes (pré-operatório e dia de avaliação), e não pareado, quando comparados animais de diferentes grupos, isto é, animais do grupo obeso comparados aos do grupo não obeso, e animais com lesão óssea comparados aos animais sem lesão óssea. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

RESULTADOS

Circunferência abdominal

Quando comparados os animais do grupo obeso e não obeso submetidos à ostectomia, os primeiros apresentaram circunferência abdominal significativamente maior ($p < 0,05$) em todos os tempos de avaliação. Neste mesmo dado, quando comparado seu valor entre o período pré-operatório e os tempos de avaliação (D3, D7, D19 e D28), houve redução significativa ($p < 0,05$) no dia três e aumento significativo ($p < 0,05$) no dia 28 após a lesão no grupo obeso. Já nos animais não obesos, o aumento significativo ($p < 0,05$) ocorreu nos dias 19 e 28 após a lesão (tabela 1 e figura 5).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das circunferências abdominais (cm) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tibia antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	Pré-op.	D3	Pré-op.	D7	Pré-op.	D19	Pré-op.	D28
Não obeso	16,93 ^{Aa} (1,21)	16,64 ^{Aa} (1,11)	18,36 ^{Aa} (1,31)	18,89 ^{Aa} (0,85)	17,75 ^{Aa} (0,82)	19,00 ^{Ba} (0,82)	16,71 ^{Aa} (1,29)	20,36 ^{Ba} (1,03)
Obeso	21,44 ^{Ab} (1,65)	20,28 ^{Bb} (1,06)	20,86 ^{Ab} (1,77)	20,36 ^{Ab} (1,38)	20,86 ^{Ab} (0,85)	21,64 ^{Ab} (1,22)	20,19 ^{Ab} (1,25)	22,44 ^{Bb} (1,27)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do pré-operatório pelo teste T pareado ($p < 0,05$)

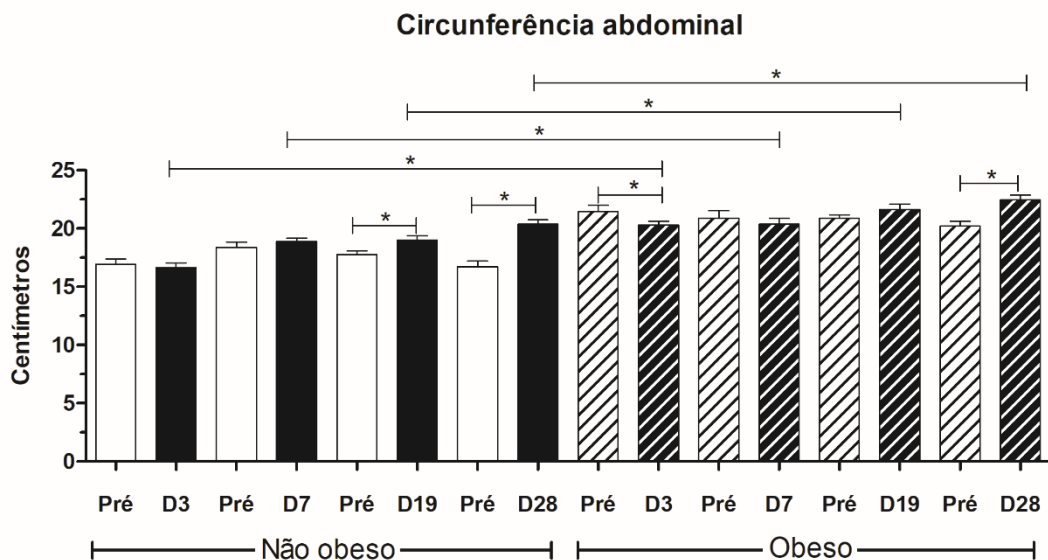


Figura 5. Gráfico das médias e desvios-padrão da circunferência abdominal (cm) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão para estudo da influência da obesidade na reparação óssea. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no pré-operatório e pela cor preta nos dias de avaliação do grupo não obeso; e pelo padrão hachurado branco no pré-operatório e hachurado preto nos dias de avaliação do grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Massa corporal

Foi observada maior massa corporal, ($p < 0,05$) nos animais do grupo obeso em todos os tempos de avaliação. Comparando este mesmo dado entre o período pré-operatório e os tempos de avaliação, observou-se aumento significativo da massa corporal nos dias 19 e 28 no grupo obeso, e nos dias sete, 19 e 28 no grupo não obeso (tabela 2 e figura 6).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão das massas corporais (g) de ratos obesos e não obesos submetidos à osteotomia monocortical proximal de tibia antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	Pré-op.	D3	Pré-op.	D7	Pré-op.	D19	Pré-op.	D28
Não obeso	352,90 ^{Aa} (30,28)	357,90 ^{Aa} (27,21)	380,40 ^{Aa} (25,21)	397,90 ^{Ba} (28,62)	344,30 ^{Aa} (25,62)	414,90 ^{Ba} (20,50)	324,00 ^{Aa} (17,27)	404,90 ^{Ba} (11,81)
Obeso	466,60 ^{Ab} (28,85)	469,30 ^{Ab} (31,02)	465,30 ^{Ab} (31,99)	473,00 ^{Ab} (35,76)	461,60 ^{Ab} (23,42)	504,90 ^{Bb} (25,18)	459,10 ^{Ab} (47,77)	512,00 ^{Bb} (46,86)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do pré-operatório pelo teste T pareado ($p < 0,05$)

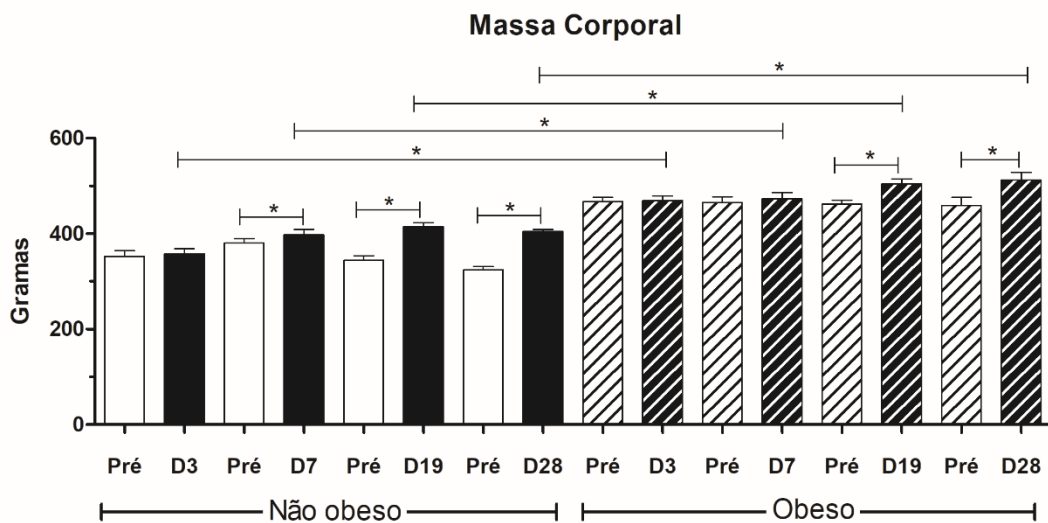


Figura 6. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa corporal (g) de ratos obesos e não obesos submetidos à osteotomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão para estudo da influência da obesidade na reparação óssea. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no pré-operatório e pela cor preta nos dias de avaliação do grupo não obeso; e pelo padrão hachurado branco no pré-operatório e hachurado preto nos dias de avaliação do grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Índice de massa corporal

O IMC foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo obeso quando comparado ao grupo não obeso em todos os tempos de avaliação (tabela 3 e figura 7A). Comparando-se com o período pré-operatório, foi observada redução significativa do IMC nos animais do grupo

obeso no dia três de avaliação e aumento significativo ($p < 0,05$) nos dias 19 e 28. No grupo não obeso houve aumento significativo ($p < 0,05$) nos dias três, 19 e 28 (tabela 3 e figura 7B).

Tabela 3. Médias e desvios-padrão do IMC de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tíbia antes da lesão e aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão.

	Pré-op.	D3	Pré-op.	D7	Pré-op.	D19	Pré-op.	D28
Não obeso	0,67 ^{Aa} (0,06)	0,73 ^{Ba} (0,07)	0,73 ^{Aa} (0,06)	0,74 ^{Aa} (0,09)	0,61 ^{Aa} (0,05)	0,75 ^{Ba} (0,05)	0,63 ^{Aa} (0,04)	0,76 ^{Ba} (0,06)
Obeso	0,92 ^{Ab} (0,04)	0,80 ^{Bb} (0,06)	0,82 ^{Ab} (0,04)	0,82 ^{Ab} (0,03)	0,77 ^{Ab} (0,04)	0,89 ^{Bb} (0,10)	0,78 ^{Ab} (0,05)	0,88 ^{Bb} (0,04)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do pré-operatório pelo teste T pareado ($p < 0,05$)

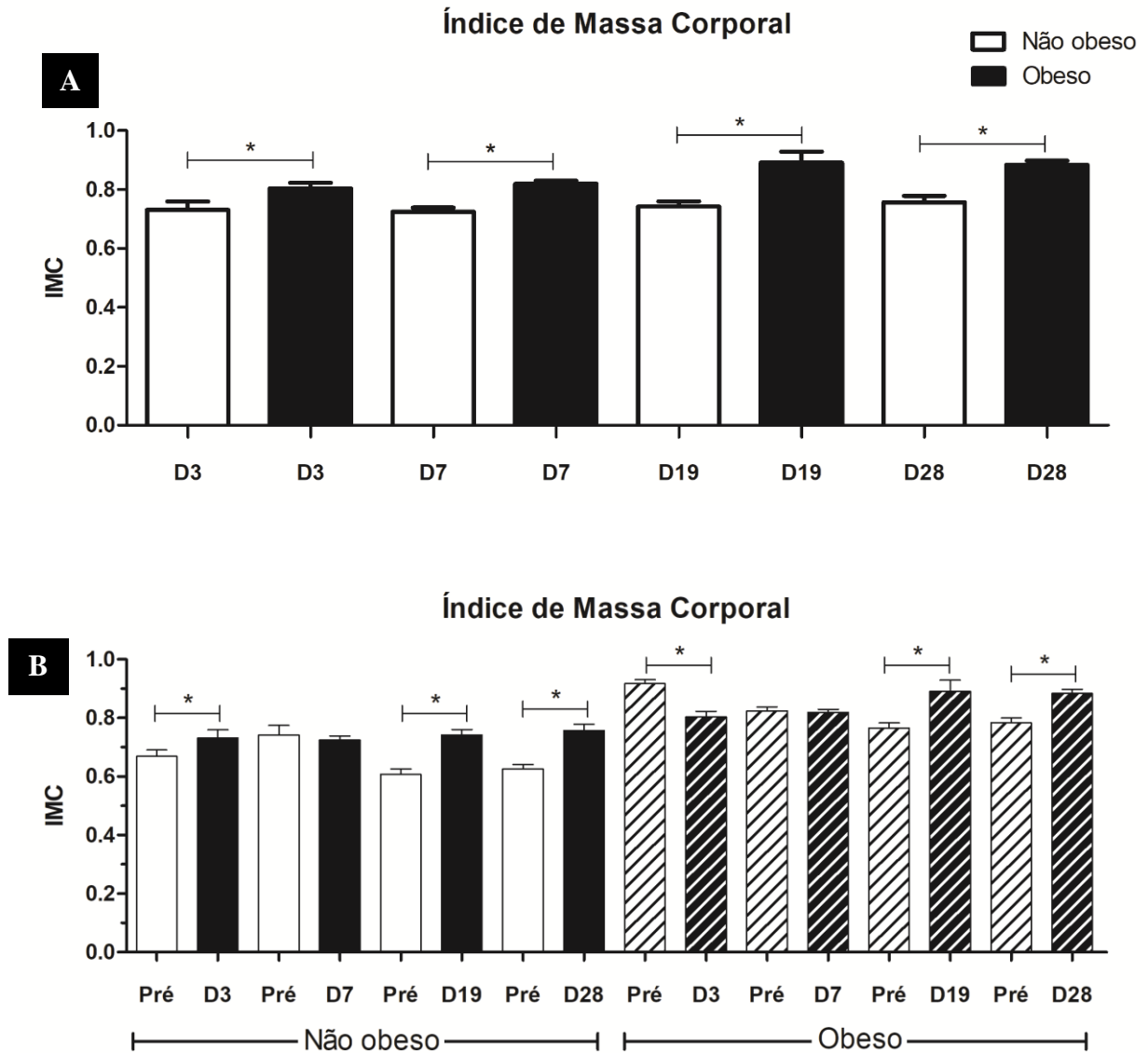


Figura 7. Gráfico do IMC. (A) Médias e desvios-padrão do IMC de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no grupo não obeso e pela cor preta no grupo obeso. (B) Médias e desvios-padrão do IMC de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia no período pré-operatório e aos três, sete, 19 e 28 dias após serem submetidos à ostectomia monocortical proximal de tibia. Diferença entre os grupos indicadas pela cor branca no pré-operatório e preta nos dias três, sete, 19 e 28 dias após a lesão no grupo não obeso, e pelo padrão hachurado branco no pré-operatório e hachurado preto nos dias três, sete, 19 e 28 dias após a lesão no grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Massa do tecido adiposo visceral

O tecido adiposo visceral apresentou massa significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais do grupo obeso em todos os tempos de avaliação. Quando este mesmo dado foi comparado entre animais controle e nos diferentes tempos de avaliação após ostectomia, a massa foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos dias 19 e 28 no grupo obeso. Por outro lado,

nos animais não obesos a massa foi significativamente menor ($p < 0,05$) no dia três e maior nos dias 19 e 28 (tabela 4 e figura 8).

Tabela 4. Médias e desvios-padrão da massa dos tecidos adiposos viscerais (g) de ratos obesos e não obesos submetidos à ostectomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	15,51 ^{Aa} (1,72)	12,73 ^{Ba} (1,90)	19,11 ^{Aa} (4,77)	23,01 ^{Ba} (6,07)	19,90 ^{Ba} (0,98)
Obeso	36,46 ^{Ab} (6,09)	41,87 ^{Ab} (13,38)	42,28 ^{Ab} (8,15)	47,10 ^{Bb} (8,41)	49,41 ^{Bb} (7,90)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

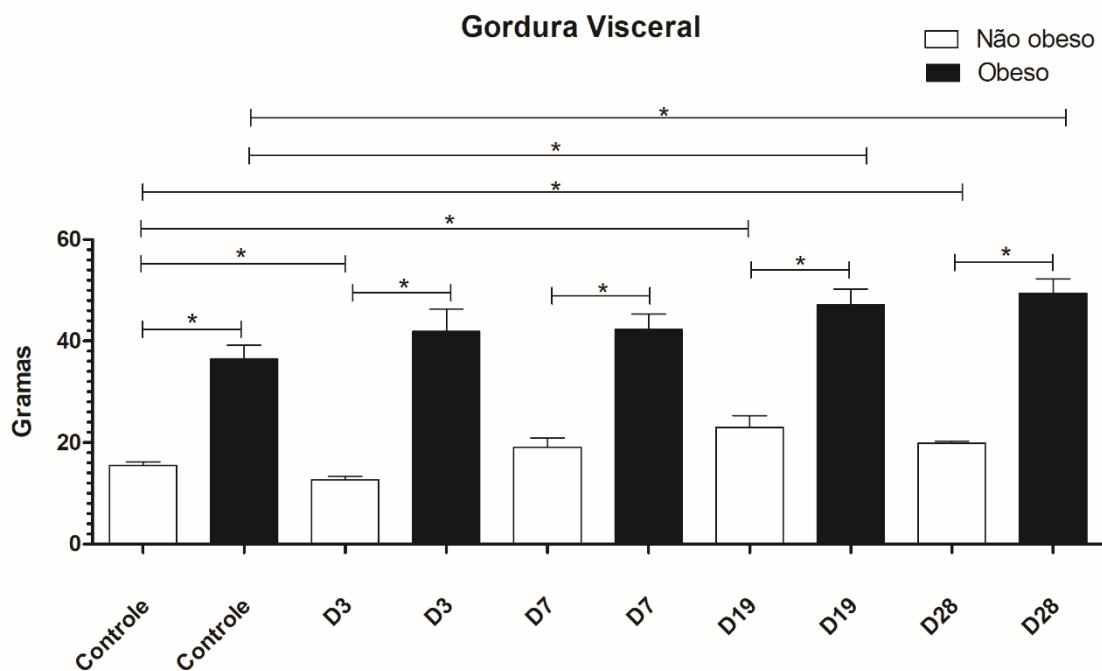


Figura 8. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa do tecido adiposo visceral (g) de ratos obesos e não obesos submetidos ou não à ostectomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão. Diferença entre grupos indicada pela cor branca no grupo não obeso e pela cor preta no grupo obeso. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Índice de adiposidade

O índice de adiposidade (IA) foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais do grupo obeso em todos os tempos de avaliação. Quando este dado foi comparado entre os tempos de avaliação após ostectomia, foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos dias 19 e 28 em ambos os grupos (tabela 5 ou figura 9).

Tabela 5. Médias e desvios-padrão do índice de adiposidade (IA) de ratos obesos e não obesos submetidos à osteotomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	3,92 ^{Aa} (0,55)	3,55 ^{Aa} (0,38)	4,79 ^{Aa} (1,09)	5,51 ^{Ba} (1,28)	5,10 ^{Ba} (0,48)
Obeso	7,39 ^{Ab} (1,10)	8,84 ^{Ab} (2,40)	8,91 ^{Ab} (1,34)	9,32 ^{Bb} (1,48)	9,62 ^{Bb} (0,87)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

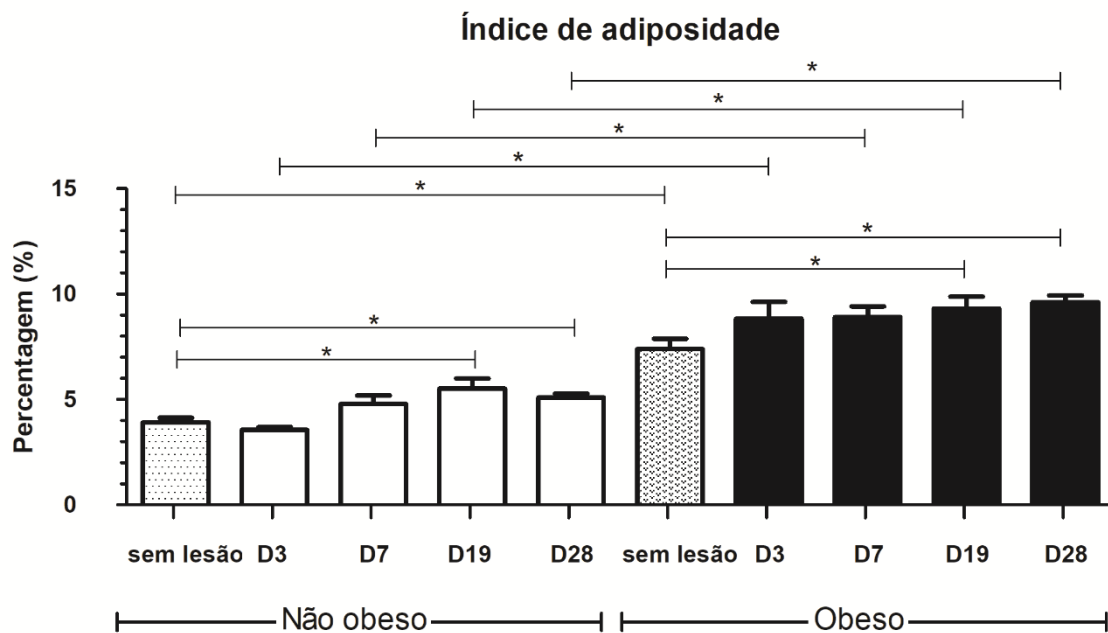


Figura 9. Gráfico das médias e desvios-padrão do índice de adiposidade (IA) de ratos obesos e não obesos submetidos à osteotomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Massa óssea

Nenhuma diferença foi observada na massa óssea entre os animais obesos e não obesos submetidos à osteotomia. Todavia, a massa óssea foi significativamente ($p < 0,05$) maior nos animais controle obesos em relação aos animais controle não obesos (tabela 6 e figura 10).

Tabela 6. Médias e desvios-padrão da massa óssea (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	0,88 ^{Aa} (0,04)	0,93 ^{Aa} (0,12)	0,96 ^{Aa} (0,09)	0,92 ^{Aa} (0,06)	0,90 ^{Aa} (0,11)
Obeso	0,98 ^{Ab} (0,11)	0,95 ^{Aa} (0,09)	1,03 ^{Aa} (0,04)	1,03 ^{Aa} (0,09)	1,01 ^{Aa} (0,12)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

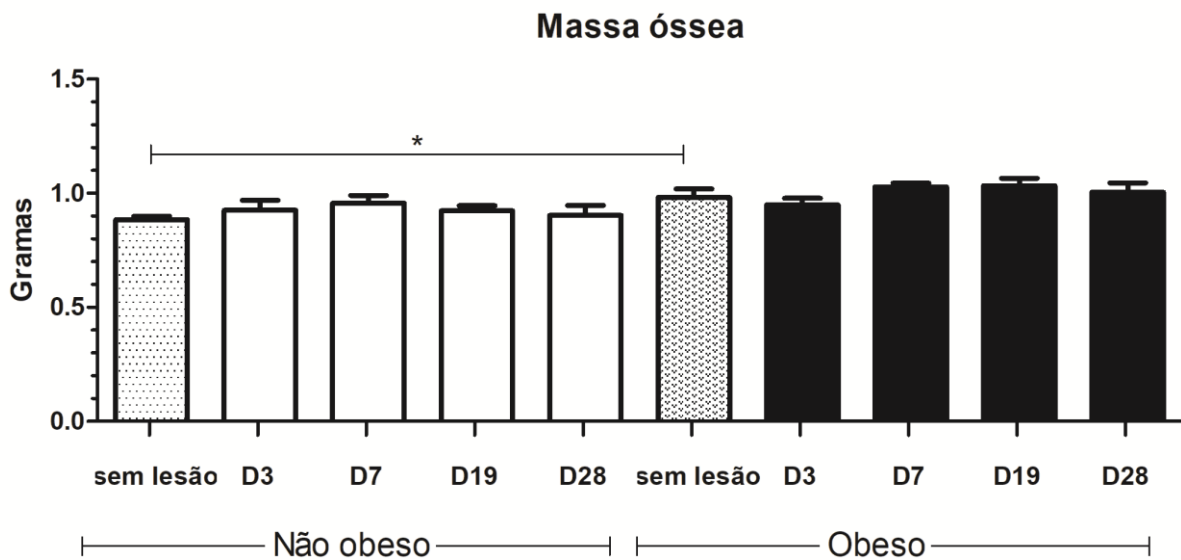


Figura 10. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa óssea (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Massa óssea orgânica

A massa óssea orgânica das tíbias de ratos obesos submetidos a ostectomia foi significativamente menor ($p < 0,05$) no dia três e maior no dia sete quando comparados aos não obesos. Observou-se maior massa óssea orgânica aos sete dias no grupo obeso e ao três no grupo não obeso, quando comparado aos seus respectivos controles (sem lesão) ($p < 0,05$). (tabela 7 e figura 11).

Tabela 7. Médias e desvios-padrão da massa óssea orgânica (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à osteotomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	0,046 ^{Aa} (0,021)	0,103 ^{Ba} (0,034)	0,044 ^{Aa} (0,005)	0,082 ^{Aa} (0,042)	0,031 ^{Aa} (0,009)
Obeso	0,048 ^{Aa} (0,021)	0,050 ^{Ab} (0,021)	0,099 ^{Bb} (0,010)	0,049 ^{Aa} (0,016)	0,041 ^{Aa} (0,012)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

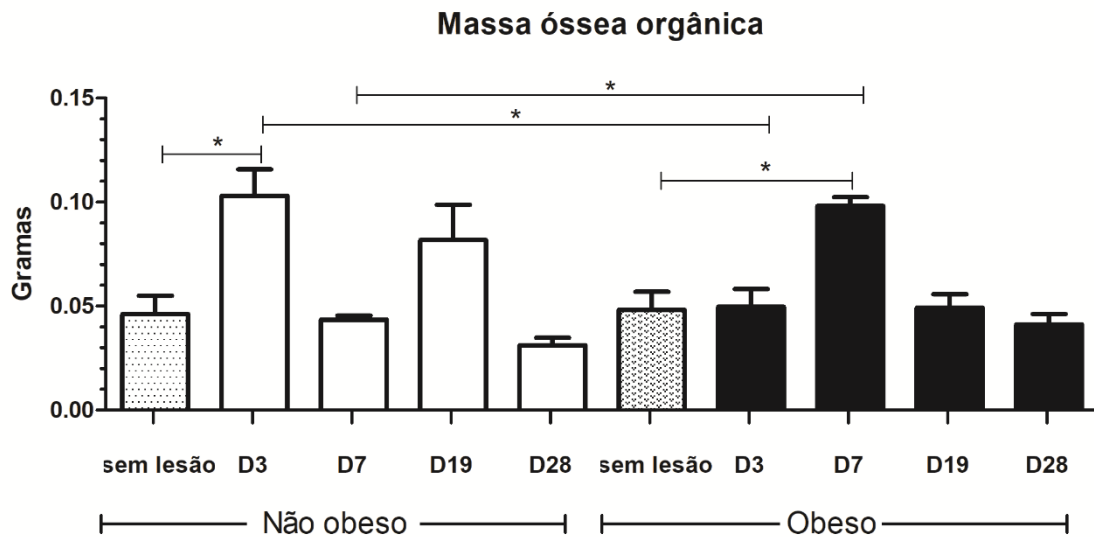


Figura 11. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa óssea orgânica (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à osteotomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Massa óssea mineral

A massa óssea mineral das tíbias de ratos submetidos à osteotomia foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo obeso aos 19 e 28 dias após a lesão quando comparado ao não obeso. Observou-se menor massa óssea mineral ($p < 0,05$) no grupo de animais obesos aos sete dias quando comparado ao controle (sem lesão). Nenhuma diferença foi observada entre a massa óssea dos animais osteotomizados e os controles no grupo de animais não obesos (tabela 8 figura 12).

Tabela 8. Médias e desvios-padrão da massa óssea mineral (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à osteotomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	0,24 ^{Aa} (0,02)	0,23 ^{Aa} (0,03)	0,23 ^{Aa} (0,02)	0,22 ^{Aa} (0,04)	0,24 ^{Aa} (0,01)
Obeso	0,26 ^{Aa} (0,03)	0,26 ^{Aa} (0,03)	0,22 ^{Ba} (0,02)	0,29 ^{Ab} (0,04)	0,28 ^{Ab} (0,03)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

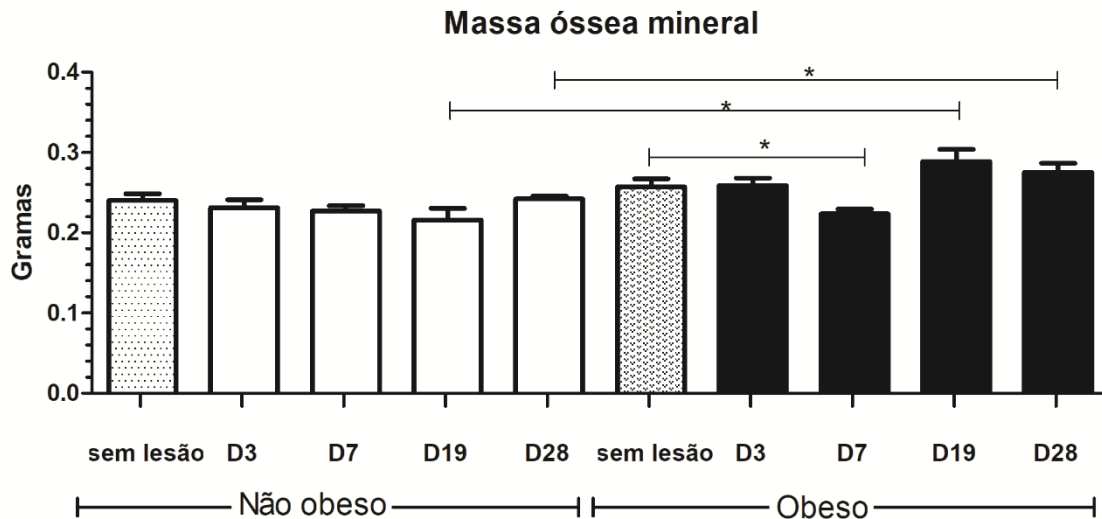


Figura 12. Gráfico das médias e desvios-padrão da massa óssea mineral (g) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas à osteotomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Força máxima

Nenhuma diferença foi observada nas forças máximas das tíbias submetidas à osteotomia entre animais obesos e não obesos. Quando comparada aos animais controle no mesmo grupo, a força máxima foi significativamente menor nos dias três e sete no grupo obeso e em todos os tempos de avaliação nos animais não obesos ($p < 0,05$). (tabela 9 e figura 13).

Tabela 9. Médias e desvios-padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a osteotomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	115,2 ^{Aa} (10,75)	77,75 ^{Ba} (14,91)	91,96 ^{Ba} (17,01)	96,43 ^{Ba} (16,90)	84,53 ^{Ba} (10,45)
Obeso	116,9 ^{Aa} (19,84)	90,14 ^{Ba} (19,70)	85,21 ^{Ba} (14,85)	107,5 ^{Aa} (15,11)	101,4 ^{Aa} (24,49)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

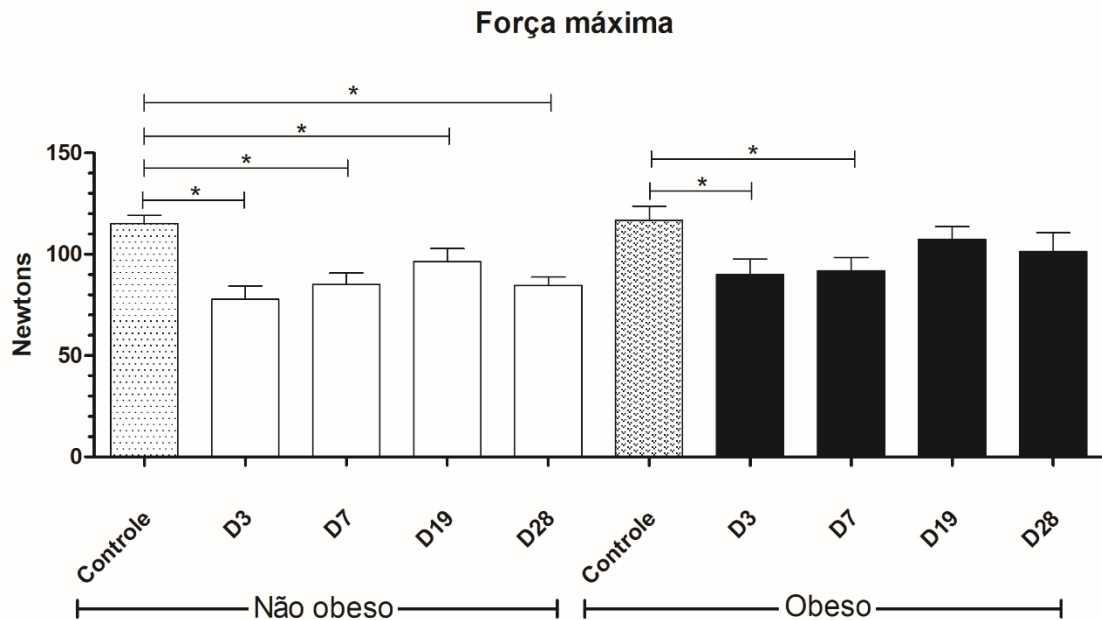


Figura 13. Gráfico das médias e desvios-padrão da força máxima (N) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a osteotomia monocortical proximal de tíbia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Deformação até falha

Não foi observada diferença na deformação até falha de tíbias de ratos submetidos à osteotomia quando comparados grupo obeso e não obeso. Também não houve diferença no grupo obeso, quanto à deformação óssea, nos tempos de avaliação após osteotomia quando comparado ao controle. Por outro lado, no grupo não obeso, a deformação até a falha foi significativamente menor em todos os dias avaliados quando comparado ao controle (tabela 10 e figura 14).

Tabela 10. Médias e desvios-padrão da deformação até falha (μm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a osteotomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	1067,00 ^{Aa} (451,10)	591,70 ^{Ba} (65,55)	620,00 ^{Ba} (182,80)	617,10 ^{Ba} (124,60)	558,60 ^{Ba} (101,20)
Obeso	725,00 ^{Aa} (164,50)	674,30 ^{Aa} (215,90)	562,90 ^{Aa} (147,50)	606,70 ^{Aa} (185,5)	552,50 ^{Aa} (190,60)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

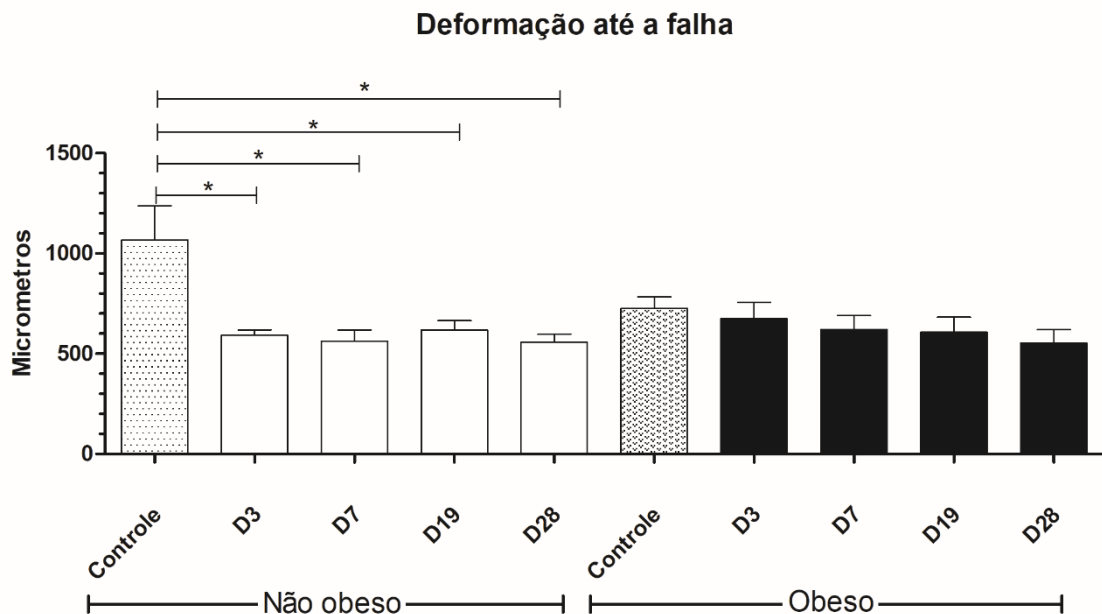


Figura 14. Gráfico das médias e desvios-padrão da deformação até a falha (μm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a osteotomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Módulo de elasticidade

O módulo de elasticidade de tíbias de ratos foi significativamente ($p < 0,05$) maior no dia 28 após a lesão no grupo obeso quando comparado ao não obeso. Não houve diferença no módulo de elasticidade em nenhum dos tempos de avaliação quando comparado ao controle tanto no grupo obeso quanto no não obeso (tabela 11 e figura 15).

Tabela 11. Médias e desvios-padrão do módulo de elasticidade (N/mm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a osteotomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	142,70 ^{Aa} (20,48)	131,10 ^{Aa} (11,02)	143,40 ^{Aa} (29,31)	159,30 ^{Aa} (28,65)	146,70 ^{Aa} (20,85)
Obeso	183,80 ^{Aa} (53,33)	155,40 ^{Aa} (33,74)	167,20 ^{Aa} (24,70)	183,30 ^{Aa} (28,87)	186,80 ^{Ab} (16,61)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

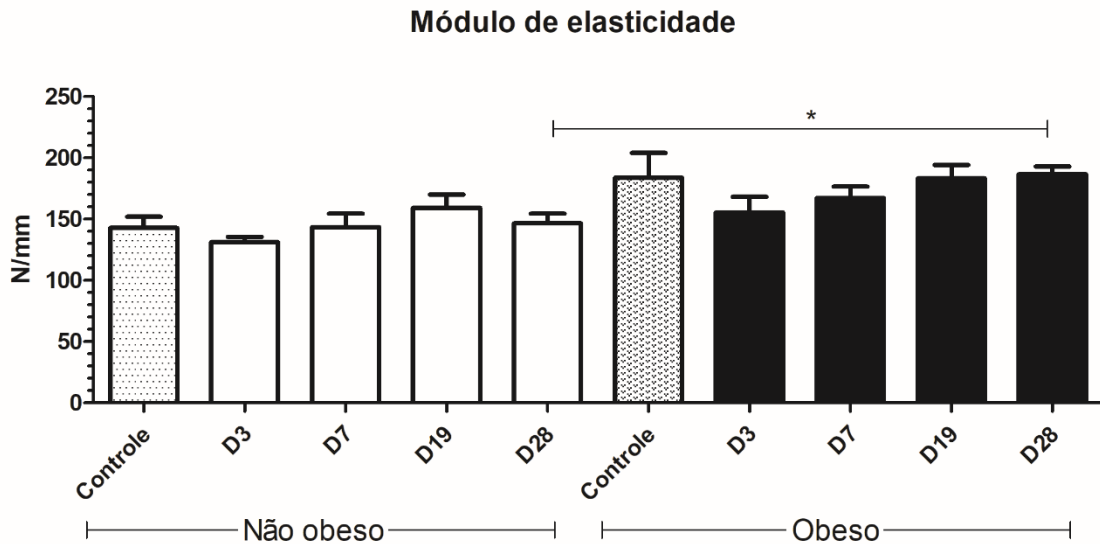


Figura 15. Gráfico das médias e desvios-padrão do módulo de elasticidade (N/mm) de tíbias de ratos obesos e não obesos submetidas ao teste de flexão em três pontos após a osteotomia monocortical proximal de tibia aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Avaliação histológica e histomorfometria

A avaliação histológica do foco de lesão mostrou que a reparação óssea foi semelhante em ambos os grupos obeso e não obeso e ocorreu por primeira intenção. Aos três dias pós-lesão foi observado tecido de granulação preenchendo toda a extensão do defeito ósseo. Aos sete dias, verificou-se o preenchimento total da região do defeito por osso trabecular saudável com trabéculas delgadas e lacunas predominantemente preenchidas por osteócitos ativos e recobertas por osteoblastos predominantemente fusiformes. As trabéculas do grupo obeso eram discretamente mais espessas quando comparadas às do grupo não obeso. Aos 19 dias após a

lesão foi observada remodelação óssea em estágio intermediário sendo o canal medular parcialmente preenchido por osso trabecular e por tecido medular, e a região cortical totalmente preenchida com osso esponjoso com trabéculas espessas e lacunas predominantemente preenchidas por osteócitos ativos e recobertas por osteoblastos predominantemente fusiformes. Aos 28 dias verificou-se processo de remodelação mais avançado com canal medular, predominantemente preenchido por tecido medular e por poucas trabéculas ósseas. A região correspondente ao defeito cortical estava totalmente preenchida por osso compacto, mas ainda em processo de remodelação (figura 16).

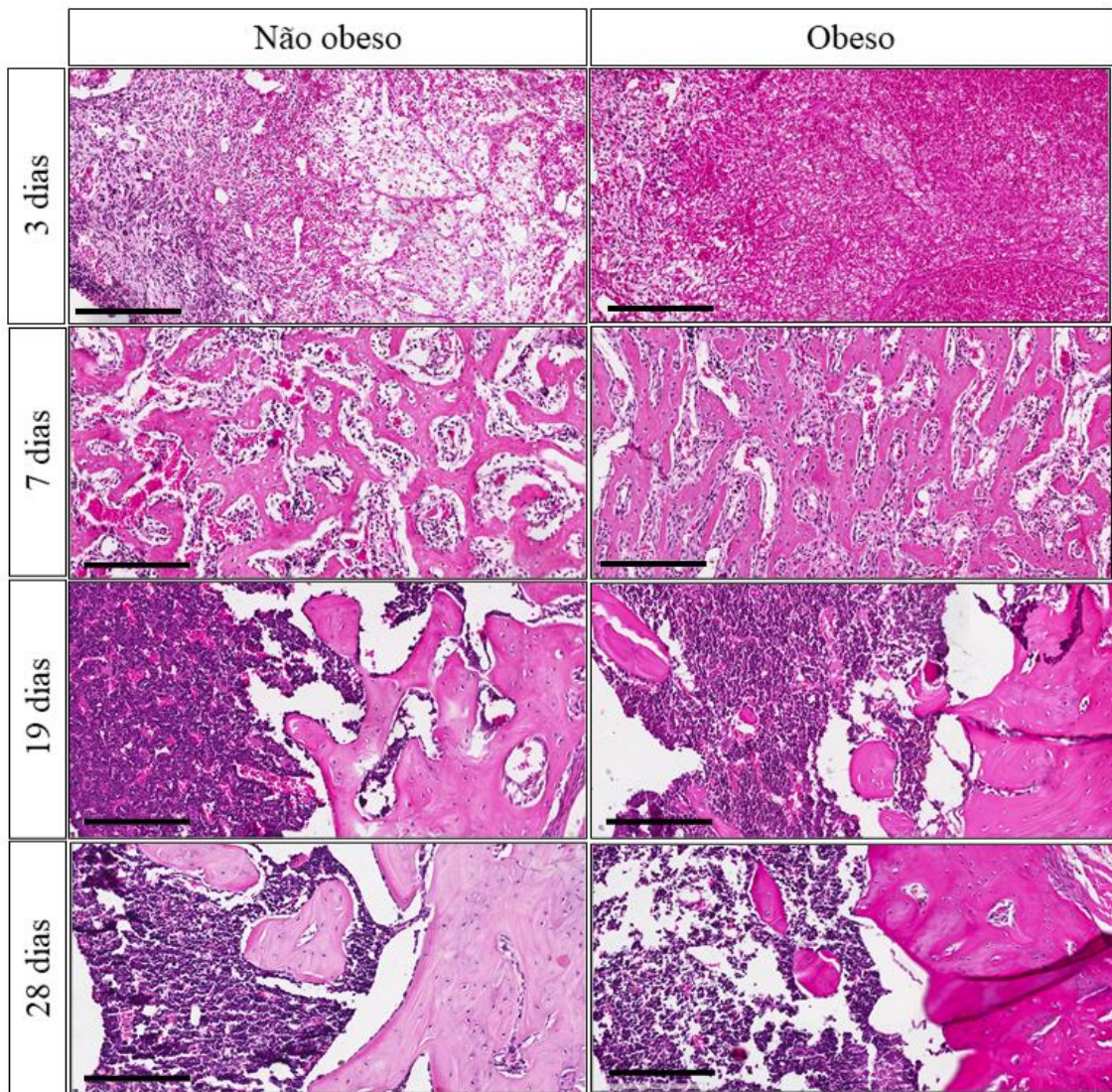


Figura 16. Micrografia do osso neoformado em defeitos ósseos de tíbias de ratos (*Rattus norvegicus*) obesos e não obesos submetidas à osteotomia monocortical proximal aos três, sete 19 e 28 dias após a lesão, para estudo da influência da obesidade na reparação óssea. Observar que a reparação óssea ocorreu de forma primária, que aos sete dias o osso neoformado é esponjoso e que aos 28 dias o processo de remodelação se encontra avançado. Hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. Barra = 200 μ m.

Verificou-se maior área de tecido ósseo no foco de lesão nos animais obesos, quando comparados aos não obesos, aos sete dias de avaliação. Em comparação com o grupo controle, não houve diferença na área de tecido ósseo em nenhum dos tempos de avaliação no grupo obeso. Entretanto, no grupo não obeso a área de tecido ósseo foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos dias sete, 19 e 28 quando comparada à do grupo controle (tabela 12 e figura 17).

Tabela 12. Médias e desvios-padrão da área do tecido ósseo ($\times 10^6 \mu\text{m}^2$) no foco da lesão de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	2,21 ^{Aa} (0,75)	3,01 ^{Aa} (1,45)	3,10 ^{Ba} (0,64)	4,12 ^{Ba} (1,05)	3,59 ^{Ba} (0,63)
Obeso	3,24 ^{Aa} (1,51)	2,74 ^{Aa} (1,31)	4,14 ^{Ab} (0,60)	3,93 ^{Aa} (1,16)	3,73 ^{Aa} (1,05)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

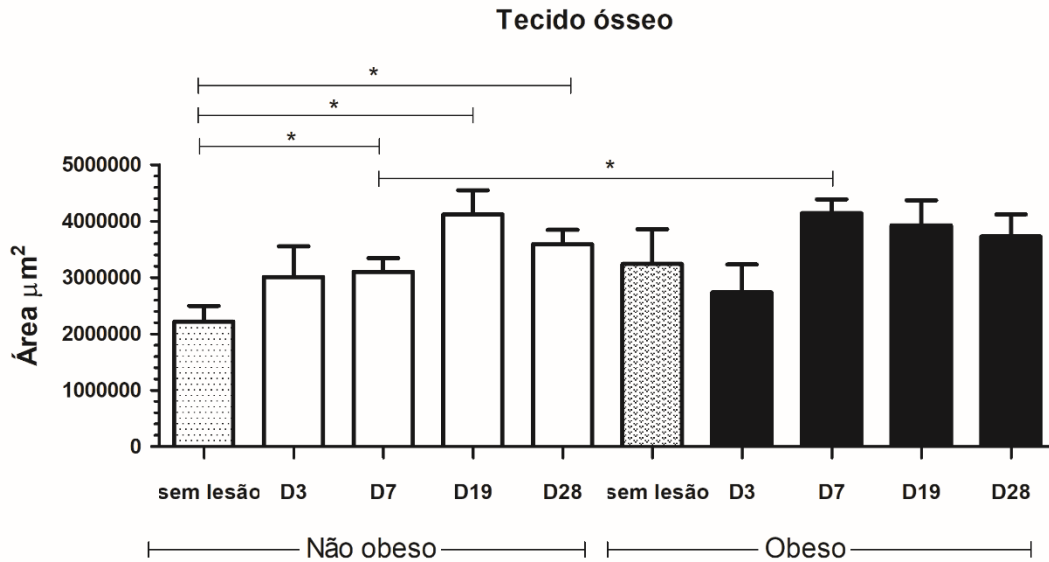


Figura 17. Gráfico das médias e desvios-padrão da área do tecido ósseo ($\times 10^6 \mu\text{m}^2$) de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre o número de osteócitos no foco da lesão de ratos obesos e não obesos em nenhum dos tempos avaliados. Contudo, observou-se

número de osteócitos significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais obesos controle quando comparados aos não obesos. No grupo obeso o número de osteócitos no foco de lesão não diferiu significativamente dos encontrados na mesma região das tíbias de animais controle. Já no grupo de animais não obesos, verificou-se número de osteócitos significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais ostectomizados em relação aos animais do grupo controle aos sete, 19 e 28 dias (tabela 13 e figura 18).

Tabela 13. Médias e desvios-padrão do número de osteócitos no foco da lesão de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

	Sem lesão	D3	D7	D19	D28
Não obeso	952,1 ^{Aa} (287,1)	1401 ^{Aa} (762,7)	2306 ^{Ba} (606,3)	2472 ^{Ba} (386,5)	1590 ^{Ba} (283,9)
Obeso	2088 ^{Ab} (1069)	1403 ^{Aa} (607,8)	2948 ^{Aa} (1028)	2034 ^{Aa} (531,1)	2482 ^{Aa} (983,8)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem do osso sem lesão pelo teste T não pareado ($p < 0,05$)

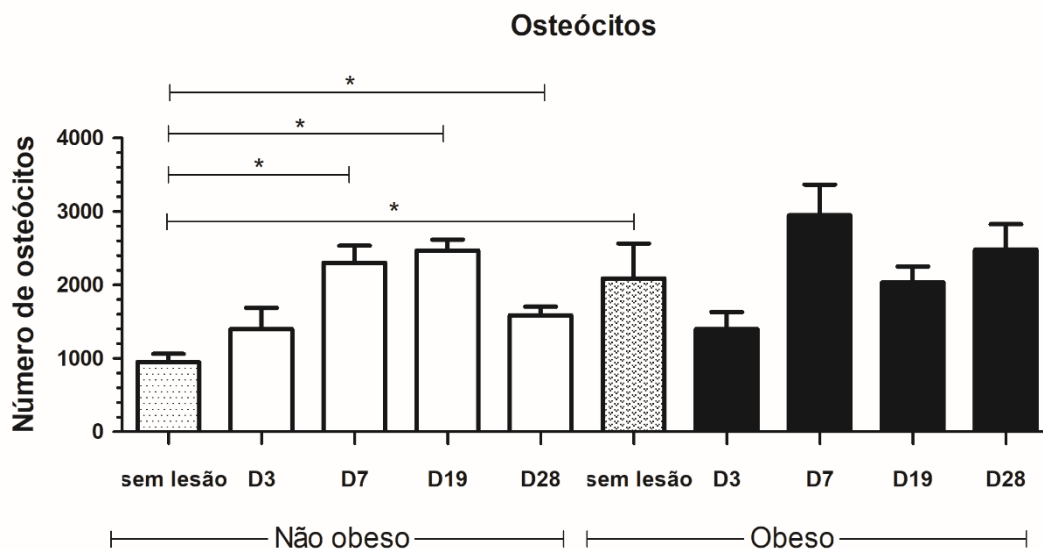


Figura 18. Gráfico das médias e desvios-padrão do número de osteócitos no foco da lesão de tíbias de ratos obesos e não obesos após a ostectomia monocortical proximal aos três, sete, 19 e 28 dias após a lesão, e à 8mm da articulação femorotibiopatelar de tíbias de ratos obesos e não obesos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Diferença entre os grupos indicadas pelo padrão pontilhado nos animais sem lesão óssea não obesos, pela cor branca nos dias de avaliação nos animais não obesos, pelo padrão em V nos animais sem lesão óssea obesos e pela cor preta nos dias de avaliação nos animais obesos. Diferença significativa indicada pelo asterisco ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O modelo animal adotado neste estudo foi o rato (*Rattus norvegicus*), e esta escolha se deveu ao seu comportamento conhecidamente dócil e seu fácil manuseio, além da facilidade na padronização dos grupos de estudo quanto ao sexo, tamanho e idade (Andrade *et al.*, 2002). Quanto à dieta experimental para indução da obesidade, o modelo escolhido se baseou na obesidade causada pela alta ingestão de carboidratos simples e açúcares, bastante comum na atualidade (Lacerda *et al.*, 2015; Lennerz & Lennerz, 2018). No presente estudo, a composição estimada da dieta experimental indica que não há grandes diferenças na quantidade de carboidratos em relação à dieta controle, contudo, observa-se diferença na qualidade dos mesmos, havendo maior concentração de sacarose proveniente da adição de leite condensado e açúcar na dieta experimental. O sucesso da promoção da obesidade nesta dieta pode ser relacionado, dentre outros fatores, à maior quantidade de sacarose. A maior quantidade desse composto está associada à ativação de enzimas lipogênicas por ativação da ChREBP (proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato) (Rutledge & Adeli, 2007; Sakiyama *et al.*, 2008), e a um maior índice glicêmico (Hao *et al.*, 2012), favorecendo a deposição de gordura. Outro fator que pode ser relacionado à promoção da obesidade nesta dieta é a alta palatabilidade. Em estudo conduzido por Yeomans (1996), o consumo de alimentos palatáveis levou à maior ingestão alimentar. Com isso, pode-se sugerir que a composição dos carboidratos da dieta experimental associada ao possível aumento da ingestão alimentar da mesma tiveram papéis fundamentais na promoção da obesidade neste estudo.

A eficiência do protocolo para indução de obesidade com dieta hipercalórica rica em carboidratos simples nos ratos do grupo obeso foi observada quando comparados os dados de circunferência abdominal, massa corporal, IMC, massa de gordura visceral e índice de adiposidade (IA) entre os grupos de estudo.

A circunferência abdominal significativamente maior ($p < 0,05$) apresentada pelos animais do grupo obeso, assim como a maior massa do tecido adiposo visceral, eram esperadas, pois também ocorreram em outros estudos que as avaliaram em animais induzidos à obesidade em modelos de dieta semelhantes (Novelli *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Barcellos, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Lacerda *et al.*, 2015). Além disso, a massa corporal, o IMC e o IA significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais obesos também eram esperados, assim como ocorreu no estudo no qual se baseou esta dieta (Lacerda *et al.*, 2015). Apesar de o IMC já ter mostrado bons resultados em alguns estudos, vale ressaltar a importância da utilização de outros métodos para avaliação da obesidade neste modelo, assim como foi executado no presente

estudo, uma vez que um estudo conduzido por Smith *et al.* (2007) verificaram ineficiência deste método em ratos. Esta ineficiência se deve ao fato de o IMC não ser um bom parâmetro para distinguir os tipos de massa, como relatado por Tjeertes *et al.* (2015). Isto é relevante pois a gordura visceral parece ser metabólica e imunologicamente ativa, sendo mais significativa que o IMC para avaliar os riscos associados à obesidade (Doyle *et al.*, 2010). Métodos mais fidedignos para a avaliação da obesidade seriam, portanto, circunferência abdominal, massa corporal, massa do tecido adiposo visceral, índice de adiposidade, histomorfometria do tecido adiposo (Daniels, 2006; Novelli *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2015), ultrassonografia (German, 2006; Okada *et al.*, 2017) e tomografia computadorizada, sendo esta considerada padrão ouro, e a circunferência abdominal por sua vez é considerada a melhor substituta (Doyle *et al.*, 2010). A tomografia computadorizada tem alto custo e requer equipamento que não está facilmente disponível, por isso, os outros métodos são alternativas viáveis.

Quando comparada entre o período pré-operatório e o tempo de avaliação, a redução significativa ($p < 0,05$) na circunferência abdominal nos animais do grupo obeso no dia três após a lesão não ocorreu no grupo não obeso. Ademais, observou-se queda significativa no valor do IMC no dia três após a lesão nos animais do grupo obeso. Estes resultados sugerem maior sofrimento pós-operatório nos animais obesos. Sabe-se que a obesidade induz uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau, assim como descrito por Osto & Lutz (2015), havendo maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (Bouassida *et al.*, 2010; Tzanavari *et al.*, 2010), que está associado a efeitos anorexigênicos sobre o hipotálamo, levando à lipólise (Himmerich & Sheldrick, 2010), podendo, portanto, explicar a redução da circunferência abdominal e do IMC nestes animais. Além disso, estudos já mostraram que indivíduos obesos têm maior propensão a complicações intra e pós-operatórias, como maior tempo cirúrgico, maior perda sanguínea, complicações na ferida cirúrgica, infecções, eventos tromboembólicos (Doyle *et al.*, 2010; Vasarhelyi & MacDonald, 2012; Tjeertes *et al.*, 2015), infarto de miocárdio, lesão de nervo periférico, infecção de trato urinário e pontuação mais alta na classificação do estado físico no score da American Society of Anesthesiologists (ASA) (Bamgbade *et al.*, 2006).

Inversamente ao que ocorreu nos parâmetros de circunferência abdominal e IMC, que sofreram redução no dia três no grupo obeso, a massa do tecido adiposo visceral foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo não obeso três dias após ostectomia, e não diferiu no grupo obeso. Isto poderia contradizer a hipótese dos efeitos deletérios da obesidade no pós-

operatório discutida acima, contudo, vale lembrar que os animais obesos continuaram a receber a dieta experimental no período após a cirurgia, e que esta dieta é rica em sacarose, composto este que estimula enzimas lipogênicas, como o ChREBP (Rutledge & Adeli, 2007; Sakiyama *et al.*, 2008). Esta enzima tem influência sobre o acúmulo de gordura visceral, assim como foi mostrado em estudo conduzido por Iizuka *et al.* (2004), no qual houve redução do tecido adiposo visceral em camundongos com deficiência de ChREBP. Isto, portanto, poderia explicar o fato de o grupo obeso, exposto à dieta hipercalórica rica em carboidratos simples, não ter perdido gordura visceral neste período. Além disso, indícios sugerem que o tecido adiposo visceral é mais dificilmente eliminado do que o subcutâneo, assim como indicado em estudo conduzido por Lacerda *et al.* (2015), no qual a realização de atividade física não foi capaz de reduzir a adiposidade visceral em ratos expostos a dieta rica em sacarose. Ademais, o acúmulo de gordura abdominal subcutânea na obesidade é mais benéfico do que o acúmulo de gordura visceral, pois esta está associada à fatores deletérios, como a esteatose hepática e a resistência à insulina (Kursawe *et al.*, 2012).

A técnica para indução de lesão óssea visou produzir maior acurácia na padronização do defeito ósseo, tanto quanto à localização, que foi monocortical e a 8 mm da articulação femorotibiopatelar, como quanto à dimensão produzida pela broca, que foi de 2 mm de diâmetro, semelhante ao que foi executado em outros estudos (Schlegel *et al.*, 2006; Frascino *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Dubrov *et al.*, 2019; Mariolani *et al.*, 2021).

A massa óssea das tíbias de ratos significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais obesos sem lesão óssea, quando comparada aos não obesos, revela que os efeitos mecânicos do sobrepeso sobre os ossos induzem a maior formação de matriz extracelular em concordância com o meio ao qual é submetido, aumentando sua massa, assim como descrito na literatura sobre o fenômeno da lei de Wolff, que define que o processo de remodelação óssea é modulado por forças mecânicas (Frost, 2001; Schindeler *et al.*, 2008; Planell, 2009), estabelecendo que o osso saudável se adapta à carga à qual é submetido (Schindeler *et al.*, 2008); e o fenômeno do efeito piezoelétrico, que consiste na característica do tecido ósseo de produzir sinais elétricos quando sob estresse mecânico (Fukada & Yasuda, 1957; Shamos *et al.*, 1963), promovendo crescimento e remodelação óssea (Cerroloza *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2017). Contudo, nos animais submetidos à ostectomia não houve diferença quanto à massa óssea quando comparados os grupos obeso e não obeso, nem quando comparados os tempos de avaliação ao grupo controle. Isto poderia ser explicado pelo fato de que, neste parâmetro, o osso foi avaliado como um todo, e não apenas como tecido ósseo; com isso, os demais tecidos presentes, como

medula e periosteio, podem ter influenciado na massa óssea. Além disso, o defeito criado é proporcionalmente pequeno quando comparado ao osso como um todo e é preenchido por tecido – de granulação ou ósseo, dependendo do tempo de avaliação –, o que pode ter impedido que fossem observadas diferenças significativas quando comparadas as massas ósseas dos animais com lesão e sem lesão. Embora não haver diferença na massa óssea entre os grupos obeso e não obeso, vale ressaltar que outros estudos mostraram que componentes pró-inflamatórios associados à obesidade interferem no metabolismo ósseo (Bray, 2004; Raffan, 2013), ou seja, ao contrário do que se acreditava anteriormente, o sobrepeso não tem efeito estritamente positivo sobre os ossos (Cao, 2011; Scheller *et al.*, 2016).

Quando comparada entre os grupos obeso e não obeso, a massa óssea orgânica foi significativamente maior ($p < 0,05$) no dia três após a lesão no grupo não obeso; porém, isto se inverteu no dia sete após a lesão, passando a ser maior no grupo obeso. Hipotetiza-se, a partir disto, que ocorreu uma reação de tecidos moles mais tardia e prolongada no grupo obeso. Sendo assim, acredita-se que, nos animais obesos deste estudo, o processo inflamatório ainda estava ativo no sétimo dia após a lesão, proporcionando maior massa óssea orgânica neste grupo. Vale lembrar que, em circunstâncias ideais, a reação inflamatória se cessa dentro de uma semana após a lesão (Loi *et al.*, 2016). Poderia ser argumentado que neste momento se observa espaço medular preenchido por osso esponjoso neoformado em micrografia de ambos os grupos, e não por tecido de granulação no grupo obeso, e que isso descartaria a hipótese acima, porém, especula-se que a maior massa óssea orgânica ao sétimo dia no grupo obeso estaria associada a uma maior reação periosteal.

A reação periosteal ocorre quando há insulto nos ossos, inclusive no insulto traumático (Rana *et al.*, 2009). O periosteio tem um papel importante na reparação óssea dada que sua camada mais interna possui osteoblastos, participando ativamente da osteogênese na injúria óssea (Loi *et al.*, 2016). Como os cortes histológicos do foco da lesão neste estudo foram transversais, não pudemos avaliar a extensão da reação periosteal na histologia. Ademais, quando a massa óssea orgânica foi comparada aos animais sem lesão óssea, ela foi significativamente maior ($p < 0,05$) no dia três no grupo não obeso, e no dia sete no grupo obeso. O aumento deste parâmetro após a injúria era esperado, afinal, a lesão óssea leva a uma resposta inflamatória e à formação de tecido cicatricial no foco da lesão e em toda a região periosteal perilesional, assim como descrito por Schindeler *et al.* (2008). Este resultado, portanto, sugere novamente que a reparação foi mais tardia e prolongada nos animais obesos.

A maior massa óssea mineral nos dias 19 e 28 no grupo obeso, quando comparada ao não obeso, pode estar relacionada à maior carga sobre os ossos nos animais obesos; com isso, o processo reparativo gerou maior formação de osso. Sendo assim, hipotetiza-se que isto esteja associado ao fenômeno da lei de Wolff e do efeito piezoelétrico sobre a remodelação óssea nestes animais, assim como descrito em diversos estudos (Wolff, 1892; Fukada & Yasuda, 1957; Shamos *et al.*, 1963; Frost, 2001; Schindeler *et al.*, 2008; Planell, 2009; Cerrolaza *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2017). Este resultado sugere, portanto, uma matriz óssea mais mineralizada nos animais obesos, uma vez que a massa óssea e a área de tecido ósseo não diferiram significativamente nestes tempos quando comparados obesos e não obesos, e que o módulo de elasticidade foi maior no grupo obeso no dia 28. Além disso, este resultado poderia também ser associado à possível reação periosteal mais intensa no grupo obeso no tempo anterior (D7), dado que o periosteio tem um papel importante na reparação óssea (Loi *et al.*, 2016), e, portanto, poderia ter melhorado a reparação nos tempos seguintes.

Quando comparada aos animais sem lesão óssea dentro de um mesmo grupo, a massa óssea mineral significativamente menor no dia sete após a lesão apenas no grupo obeso pode estar relacionada às fases iniciais da reparação óssea, nas quais há presença de fibrina e tecido de granulação, além de reabsorção dos bordos da lesão por ação osteoclástica, assim como descrito por Schindeler *et al.* (2008). Poderia também se discutir que a matriz óssea do osso neoformado é menos mineralizada do que a matriz óssea madura, como já descrito na literatura (Hernandez *et al.*, 2004; Vernon *et al.*, 2012). Além disso, a menor massa óssea mineral neste grupo poderia estar associada a um possível processo inflamatório exacerbado e prolongado nestes animais em decorrência da obesidade, o que poderia levar a maior osteoclasia e, portanto, menor massa óssea mineral. Esta associação foi feita anteriormente em estudo conduzido por Gao *et al.* (2018), em que camundongos obesos apresentaram níveis séricos de TNF- α persistentemente aumentados após a lesão óssea; esta duração prolongada de TNF- α – que não ocorreu nos animais não obesos – foi relacionada com uma maior diferenciação de CTMs em osteoclastos no estudo.

Ainda nesta linha de raciocínio, outro fenômeno foi descrito por Kayal *et al.* (2010), que relacionaram a maior concentração de TNF- α ao estímulo de genes apoptóticos por ativação da proteína *Forkhead Box O1* (FOXO1) no processo de reparação de fratura. Além disso, Ko *et al.* (2015) concluíram em estudo que o TNF- α reduziu a proliferação e aumentou a apoptose de CTMs na reparação óssea. Contudo, vale notar que, apesar de a massa óssea mineral ser menor no dia sete do grupo obeso quando comparada ao grupo sem lesão, ela não diferiu

significativamente do grupo não obeso neste tempo de avaliação, o que pode descreditar esta hipótese.

No teste de flexão em três pontos, a ausência de diferença significativa na força máxima entre obesos e não obesos mostra que a obesidade não interfere na capacidade do osso de suportar carga. Contudo, quando os animais ostectomizados foram comparados ao grupo controle, a menor força máxima das tíbias em todos os tempos de avaliação no grupo não obeso e apenas nos dias três e sete no grupo obeso – não diferindo nos dias 19 e 28 – revela que, apesar de ocorrer redução da força máxima óssea no osso lesionado, houve recuperação da força máxima mais precocemente nos animais obesos. Vale lembrar que a força máxima consiste no máximo de carga que o osso suporta antes de fraturar (Forestier-Zhang & Bishop, 2015), e já era esperado que ocorresse redução deste parâmetro após a lesão óssea, especialmente nos dias três e sete pós-ostectomia, nos quais o processo de reparação provavelmente ainda estava na fase inicial de inflamação e reparação, como observado na histologia óssea, momento esses em que a osteogênese estaria se iniciando, possivelmente com diferenciação de CTMs e células osteoprogenitoras do periósteo em osteoblastos e com síntese o tecido ósseo neoformado (Loi *et al.*, 2016). Já nos dias 19 e 28, o processo de reparação óssea estaria em fase final, na qual há remodelação óssea em conformação semelhante à original (Schindeler *et al.*, 2008). Portanto, a recuperação da força máxima mais precoce observada no grupo obeso reforça o efeito mecânico positivo da sobrecarga sobre a remodelação óssea nos animais obesos, assim como descrito na lei de Wolff e do efeito piezoelétrico (Wolff, 1892; Fukada & Yasuda, 1957).

A ausência de diferença na deformação até falha quando comparados animais obesos e não obesos mostra que a obesidade não interferiu significativamente neste parâmetro. Além disso, quando comparados ao grupo controle, constatou-se deformação até falha de tíbias significativamente menor apenas nos animais não obesos, não diferindo em nenhum dos tempos de avaliação nos animais do grupo obeso. A deformação até falha é o máximo de deformação que o osso suporta antes de fraturar (Forestier-Zhang & Bishop, 2015). Este resultado sugere que houve perda da resistência óssea à deformação após a lesão no grupo não obeso, e poderia indicar que as tíbias dos ratos obesos se mostraram mais resistentes a este teste; contudo, vale notar que a deformação até a falha não diferiu significativamente quando comparada entre os grupos obeso e não obeso, descartando esta possibilidade.

Nota-se, porém, que a deformação até a falha do grupo obeso sem lesão óssea foi numericamente bastante inferior à do grupo não obeso sem lesão óssea. Este fato poderia justificar o porquê a deformação até a falha foi significativamente menor apenas nos grupos

não obesos após a lesão, uma vez que o grupo controle não obeso já mostrava um valor bastante superior neste teste. Neste caso, indicaria que o osso sem lesão do grupo obeso tem menor resistência ao teste de deformação, mesmo sem falha óssea, o que poderia indicar maior susceptibilidade a fraturas em indivíduos obesos. A literatura no assunto é controversa (Sabhaney *et al.*, 2014); diversos estudos sugerem haver relação entre a obesidade e um maior risco de fraturas, especialmente em extremidades (Taylor, 2006; Adams *et al.*, 2012; Backstrom *et al.*, 2012; Kessler *et al.*, 2012; Compston, 2013; Kim *et al.*, 2013), enquanto outros estudos indicam não haver diferença significativa entre indivíduos obesos e não obesos na ocorrência de fraturas (Doan, *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2013; Sabhaney *et al.*, 2014). Ainda assim, vale ressaltar que o fato de não haver redução no valor da deformação até falha nos animais obesos, mesmo após a lesão, poderia sugerir que a maior carga à qual os ossos dos animais obesos são submetidos promove maior produção de matriz óssea – como observado na área de tecido ósseo ao sétimo dia – e maior mineralização – como observado na massa óssea mineral aos 19 e 28 dias – no grupo obeso, estando associada à lei de Wolff (Frost, 2001; Planell, 2009) e do efeito piezoelétrico (Fukada & Yasuda, 1957; Cerrolaza *et al.*, 2017).

Outra hipótese que poderia explicar o melhor o resultado dos animais obesos nos testes mecânicos estaria relacionada ao fato de que os ossos destes animais são, como um todo, maiores do que os dos ratos não obesos, assim como constatado na avaliação da massa óssea, fazendo com que o defeito ósseo de 2 mm seja proporcionalmente menor nos animais obesos e, portanto, haveria menor influência deste defeito nos testes mecânicos neste grupo, obtendo melhores resultados. Sob outra perspectiva, poderia ser argumentado que valor da deformação até falha decresce quando há maior mineralização óssea, o que torna o osso menos dúctil, ou seja, com menor capacidade de deformação sem fraturar. Sabe-se que mineralização óssea ideal promove proporções ideais de rigidez e fragilidade, (Turner, 2002), podendo-se especular que os efeitos mecânicos da obesidade tenham promovido estas proporções ideais nas tíbias dos ratos obesos deste estudo.

O maior módulo de elasticidade de tíbias observado no grupo obeso no dia 28 após a lesão, quando comparado ao não obeso, pode ser explicado pela maior massa óssea mineral observada nesse mesmo grupo aos 19 e 28 dias de avaliação. O módulo de elasticidade é a resistência do osso à deformação. Este teste tem relação próxima com a mineralização da matriz extracelular – ou seja, ele está intimamente relacionado à quantidade de colágeno e de mineral no osso –, o que torna o osso mais resistente à deformação elástica e aumenta o valor do módulo de elasticidade (Forestier-Zhang & Bishop, 2015). Portanto, este resultado indica haver melhor

resistência à deformação elástica no grupo obeso, ou seja, possivelmente houve mineralização ideal da matriz extracelular neste grupo. Este resultado é coerente, uma vez que a massa óssea mineral foi maior no grupo obeso no dia 28 de avaliação. Não é possível afirmar o porquê isso ocorreu, mas, mais uma vez, o resultado sugere que os efeitos da sobrecarga sobre os ossos na obesidade foram positivos, corroborando com a lei de Wolff e do efeito piezoelétrico (Wolff, 1892; Fukada & Yasuda, 1957), possivelmente havendo maior estímulo de osteoblastos na produção de matriz óssea neste grupo, assim como observado na histomorfometria do dia sete nos animais obesos, que revelou maior área de tecido ósseo neste grupo.

A histologia dos ossos nos diferentes dias de avaliação revelou que o processo de reparação óssea ocorreu de forma primária. Isto se deve ao fato de que, neste estudo, o tipo de falha provocada permitiu estabilidade absoluta da lesão. Isto permite que ocorra deposição direta de tecido ósseo no local da lesão, não havendo formação de calo (Perren, 2002; Schindeler *et al.*, 2008). Na injúria óssea, a cascata de reparação tem início com a ruptura da vasculatura local, a formação de hematoma (Schindeler *et al.*, 2008) e de uma rede de fibrina provisória. Esta rede possibilita o influxo de células inflamatórias no local da lesão (Vernon *et al.*, 2012; Loi *et al.*, 2016) que fagocitam a rede de fibrina e as células necróticas, ocorrendo liberação de mediadores quimiotáticos e inflamatórios, como o TNF- α e a IL-6, que atraem CTMs e células osteoprogenitoras ao local da lesão (Kon *et al.*, 2001; Bielby *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013). O hematoma é, então, eliminado e a reação inflamatória se cessa dentro de uma semana (Loi *et al.*, 2016). Com isso, há formação de tecido ósseo neoformado (Hernandez *et al.*, 2004; Loi *et al.*, 2016). Este tipo de tipo de tecido apresenta conformação desorganizada e matriz extracelular irregular. A deposição deste tecido é facilmente observada nas lâminas do dia sete em ambos os grupos obeso e não obeso. À análise qualitativa deste dia, o grupo obeso aparenta ter trabéculas mais espessas do que os animais não obesos. Isto não foi constatado na análise de massa óssea mineral, porém, foi constatado na análise de área de tecido ósseo no foco da lesão, como será descrito mais à frente. Além disso, apesar de não analisada neste estudo, vale lembrar que a reação periosteal ocorre quando há estímulo periosteal, inclusive no insulto traumático (Rana *et al.*, 2009).

O perióstio tem um papel importante na reparação óssea dada que sua camada mais interna possui osteoblastos, participando ativamente da osteogênese na injúria óssea (Loi *et al.*, 2016). A possível presença de reação periosteal explicaria a maior massa óssea orgânica aos sete dias no grupo obeso, configurando maior resposta inflamatória neste grupo. Esta inflamação não afetou a formação óssea, sendo até favorável em alguns dos parâmetros

avaliados neste estudo. Isto é respaldado pela literatura, uma vez que a inflamação é, até certo ponto, favorável à formação óssea, pois é responsável por atrair CTMs e células osteoprogenitoras ao local da lesão pela liberação de mediadores quimiotáticos e inflamatórios, como o TNF- α e a IL-6 (Kon *et al.*, 2001; Bielby *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013). Já foi descrito que a utilização de anti-inflamatórios inibidores seletivos e não seletivos de cicloxigenase-2 (COX-2) tem efeitos negativos na reparação de fraturas (Gerstenfeld & Einhorn, 2004; Seidenberg & An, 2004). Quanto à análise histológica nos tempos de avaliação seguintes, foi possível observar que, nos estágios finais da reparação óssea, o processo de reparação levou ao retorno do tecido ósseo à configuração semelhante à original, assim como descrito por Schindeler *et al.* (2008).

Quanto à histomorfometria do tecido ósseo no foco da lesão, quando comparada entre os grupos obeso e não obeso, a maior área de tecido ósseo apenas nos animais obesos no dia sete após a lesão corresponde ao fato de que nestes animais também se observou trabéculas ósseas mais espessas na análise histológica. Isto evidencia formação óssea mais intensa neste grupo quando comparado ao não obeso, o que poderia estar associado aos efeitos da sobrecarga na mecanotransdução dos ossos, favorecendo a formação óssea (Fukada & Yasuda, 1957; Frost, 2001; Planell, 2009; Cerrolaza *et al.*, 2017). Além disso, a maior reação inflamatória apresentada por este grupo – constatada pela maior massa óssea orgânica – poderia ter favorecido a formação óssea por mecanismos quimiotáticos responsáveis por atrair CTMs e células osteoprogenitoras ao local da lesão (Kon *et al.*, 2001; Bielby *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013), favorecendo o processo de reparação óssea. Quando comparados aos animais sem lesão, a maior área de tecido ósseo nos dias sete, 19 e 28 nos animais não obesos indica que houve formação óssea nestes grupos, considerando-se que, após a reação inflamatória, o processo de reparação óssea segue para a formação de matriz óssea neoformada (Hernandez *et al.*, 2004; Loi *et al.*, 2016), assim como foi observado na histologia do dia sete. O tecido ósseo neoformado é sintetizado por osteoblastos maduros diferenciados de células osteoprogenitoras na presença de fatores osteogênicos, e se forma rapidamente no foco da lesão. Este tecido, então, será substituído por tecido hematopoiético no canal medular e por tecido ósseo lamelar na cortical durante nas fases seguintes (Vernon *et al.*, 2012), assim como observado na histologia dos dias 19 e 28, corroborando com os resultados obtidos na avaliação da área de tecido ósseo. O terceiro dia após a lesão corresponde à fase inicial da reparação óssea, caracterizada pela presença de hematoma, rede de fibrina e tecido de granulação (Schindeler *et al.*, 2008), portanto, era esperado que não fosse observada formação óssea nesta fase,

corroborando com a ausência de diferença na área de tecido ósseo ao terceiro dia no grupo não obeso quando comparado ao grupo controle. Contudo, poderia ser esperada uma menor área de tecido ósseo neste tempo de avaliação, uma vez que foi realizado um defeito ósseo na tíbia, mas isso não ocorreu, possivelmente por ser um defeito pequeno.

Quando comparados os grupos obeso e não obeso, o número de osteócitos significativamente maior nos animais obesos do grupo controle indica que o sobrepeso levou a um maior número de osteócitos. Quando comparados ao grupo controle, o maior número de osteócitos nos animais não obesos nos dias sete, 19 e 28 pode estar relacionado à formação óssea a partir do dia sete no processo de reparação. Sabe-se que após o período inflamatório da reparação óssea ocorre a formação de tecido ósseo neoformado, como pôde ser observado na histologia do foco da lesão, principalmente do dia sete. Este tipo de tecido aparenta ter um número de osteócitos de quatro a oito vezes maior que o tecido ósseo lamelar (Hernandez *et al.*, 2004), portanto, o aumento de número deste tipo celular é coerente e esperado, e o fato de não ter ocorrido no grupo obeso poderia significar que a reparação óssea foi prejudicada neste tempo de avaliação, dado que os osteócitos são células iniciadoras do processo de remodelação óssea (Rocheffort *et al.*, 2010). Contudo, como descrito acima, o número de osteócitos foi significativamente maior nos animais obesos sem lesão óssea, quando comparados aos não obesos sem lesão óssea. Este resultado é importante, pois indica que o sobrepeso nos ratos sem lesão óssea levou a um maior número de osteócitos, o que possivelmente está associado aos efeitos mecânicos da sobrecarga nos ossos, uma vez que os osteócitos iniciam o processo de remodelação óssea e são capazes de detectar pressões e cargas mecânicas (Rocheffort *et al.*, 2010). Hipotetiza-se que seja necessário um maior número de osteócitos para manter a integridade da matriz extracelular submetida à maior carga nos animais obesos, mesmo que sem lesão óssea.

É importante notar que nas análises de composição óssea e nos testes mecânicos o osso é avaliado por inteiro, isto é, como órgão, enquanto nas análises histológicas e de histomorfometria o osso é avaliado como um tecido, isto é, em um corte. Em alguns dos testes deste estudo que avaliavam o osso órgão, uma das hipóteses formuladas foi que reação inflamatória exacerbada no grupo obeso teria interferido nos primeiros momentos da reparação óssea, contudo, esta hipótese não foi confirmada na análise histológica e na histomorfometria, e pôde ser contestada mesmo nas análises do osso órgão. Mais que isso, a reação inflamatória pareceu, por vezes, até favorecer a formação óssea, ou pelo menos não interferir no processo de reparação. Contudo, vale lembrar que o modelo de lesão óssea produzido neste estudo

induziu à reparação óssea primária, e poderia ser argumentado que, neste tipo de reparação, o osso poderia se beneficiar em alguns dos eventos da reparação óssea por ser um tipo de reparação óssea direta, e por já possuir, previamente à lesão, um osso mais resistente aos testes e avaliações aplicados neste estudo. Em contrapartida, um estudo conduzido por Gao *et al.* (2018), no qual o defeito ósseo produzido promoveu reparação óssea secundária, foi observada reparação óssea significativamente mais lenta nos animais obesos. Isto sugere que o tipo de lesão óssea é relevante na eficácia na reparação óssea na obesidade.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado este estudo, pode-se dizer que a obesidade não prejudica a reparação óssea do tipo primária. Pelo contrário, alguns aspectos – como a neoformação óssea e a resistência do osso neoformado – são favorecidos pela obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOPOULOUS, I. E. Inflammation in bone physiology and pathology. **Current Opinion in Rheumatology**. v. 30, n. 1, p. 59–64, 2018.
- ADAMS, A. L.; KESSLER, J. I.; DERAMERIAN, K.; SMITH, N.; BLACK, M. H.; PORTER, A. H.; JACOBSEN, S. J. & KOEBNICK, C. Associations between childhood obesity and upper and lower extremity injuries. **Injury Prevention**, v. 19, n. 3, p. 191–197, 2012.
- ALI ASSAD, N. & SOOD, A. Leptin, adiponectin and pulmonary diseases. **Biochimie**. v. 94, n. 10, p. 2180–2189, 2012.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C. & OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- AYAGARA, A. R.; LANGLET, A. & HAMBLI, R. On dynamic behavior of bone: Experimental and numerical study of porcine ribs subjected to impact loads in dynamic three-point bending tests. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. v. 98, p. 336-347, 2019.
- BACKSTROM, I. C.; MACLENNAN, P. A.; SAWYER, J. R.; CREEK, A. T.; RUE, L. W. & GILBERT, S. R. Pediatric obesity and traumatic lower-extremity long-bone fracture outcomes. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 73, n. 4, p. 966–971, 2012.
- BAMGBADE, O. A., RUTTER, T. W., NAFIU, O. O., & DORJE, P. Postoperative Complications in Obese and Nonobese Patients. **World Journal of Surgery**, v. 31, n. 3, p. 556-560, 2006.
- BARCELLOS, A. M. **Sistema serotoninérgico está envolvido na modulação da ingestão alimentar e massa corporal de maneira dependente da dieta e treinamento físico**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Esporte). Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 102 p. 2012.
- BEAUPIED, H.; LESPESSAILLES, E. & BENHAMOU, C-L. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 3, p. 233–239, 2007.
- BEHONICK, D. J.; XING, Z.; LIEU, S.; BUCKLEY, J. M.; LOTZ, J. C.; MARCUCIO, R. S.; WERB. Z.; MICLAU, T. & COLNOT, C. Role of Matrix Metalloproteinase 13 in Both Endochondral and Intramembranous Ossification during Skeletal Regeneration. **PLOS ONE**, v. 2, n. 11, p. 1–10, 2007.
- BEN-ZVI, Y.; REZNIKOV, N.; SHAHAR, R. & WEINER, S. 3D Architecture of Trabecular Bone in the Pig Mandible and Femur: Inter-Trabecular Angle Distributions. **Frontiers in Materials**, v. 4, p. 1-15, 2017.
- BIELBY, R.; JONES, E. & MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, n. 1, p. S26–S32, 2007.
- BOUASSIDA, A.; CHAMARI, K.; ZAOUALI, M.; FEKI, Y.; ZBIDI, A. & TABKA, Z. Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise. **British Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 9, p. 620–630, 2010.
- BRAY, G. A. Medical Consequences of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583–2589, 2004.

- BREDELLA, M. A.; TORRIANI, M.; GHOMI, R. H.; THOMAS, B. J.; BRICK, D. J.; GERWECK, A. V., ROSEN, C. J.; KLIBANSKI, A. & MILLER, K. K. Vertebral Bone Marrow Fat Is Positively Associated with Visceral Fat and Inversely Associated With IGF-1 in Obese Women. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 49–53, 2010.
- BUDZIK, J. F.; LEFEBVRE, G.; BEHAL, H.; VERCLYTTE, S.; HARDOUIN, P.; TEIXEIRA, P. & COTTON, A. Bone marrow perfusion measured with dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging is correlated to body mass index in adults. **Bone**, v. 99, p. 47-52, 2017.
- CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 8.ed. Nova York (NY): H. Wiley & Sons, 2012. 852 p., il.
- CAMPBELL, J.; ALQHATANI, A.; McRAE, L.; KISSOON, N. & DOAN, Q. Body Mass Index and the Odds of Acute Injury in Children. **Pediatric Emergency Care**, v. 29, n. 1, p. 21–25, 2013.
- CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 6, p. 1-7, 2011.
- CASHMAN, K. D. & GINTY, F. Intramembranous Ossification (Development of Flat Bone). In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. & TRUGO, L. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. Baltimore (MD): Academic Press, p. 557–565, 2003.
- CERROLAZA, M., DUARTE, V., & GARZÓN-ALVARADO, D. Analysis of Bone Remodeling Under Piezoelectricity Effects Using Boundary Elements. **Journal of Bionic Engineering**, v. 14, n. 4, p. 659–671, 2017.
- COMPSTON, J. E.; WATTS, N. B.; CHAPURLAT, R.; COOPER, C.; BOONEN, S.; GREENSPAN, S.; PFEILSCHIFTER, J.; SILVERMAN, S.; DÍEZ-PÉREZ, A.; LINDSAY, R.; SAAG, K. G.; NETELENBOS, C.; GEHLBACH, S.; HOOVEN, F. H.; FLAHIVE, J.; ADACHI, J. D.; ROSSINI, M.; LACROIX, A. Z.; ROUX, C.; SAMBROOK, P. N. & SIRIS, E. S. Obesity Is Not Protective against Fracture in Postmenopausal Women: GLOW. **The American Journal of Medicine**, v. 124, n. 11, p. 1043–1050, 2011.
- COMPSTON, J. Obesity and Bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 11, n. 1, p. 30–35, 2013.
- CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. 2.ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2003. 371p., il.
- DALLAS, S. L. & BONEWALD, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 437–443, 2010.
- DANIELS, S. R. The Consequences of Childhood Overweight and Obesity. **The Future of Children**, v. 16, n. 1, p. 47–67, 2006.
- DOAN, Q.; KOEHOORN, M. & KISSOON, N. Body mass index and the risk of acute injury in adolescents. **Paediatrics & Child Health**, v. 15, n. 6, p. 351–356, 2010.
- DOYLE, S. L., LYSAGHT, J., & REYNOLDS, J. V. Obesity and post-operative complications in patients undergoing non-bariatric surgery. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 12, p. 875-886, 2010.
- DUBROV, V. E.; KLIMASHINA, E. S.; SHCHERBAKOV, I. M.; SHIPUNOV, G. A.; PUTLYAEV, V. I.; EVDOKIMOV, P. V.; TIKHONOV, A. A.; ZYUZIN, D. A.; DANILOVA, N. V. & MAL'KOV, P. G. Experimental Evaluation of the Properties of 3D Porous Bone

Substitute Based on Calcium Phosphate on the Model of Monocortical Diaphysial Femur Defect in Rats. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 167, n. 3, p. 400-403, 2019.

ECKEL, R. H. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 105, n. 24, p. 2923–2928, 2002.

EDWARDS, M. H.; WARD, K. A.; NTANI, G.; PARSONS, C.; THOMPSON, J.; SAYER, A. A.; DENNISON, E. M. & COOPER, C. Lean mass and fat mass have differing associations with bone microarchitecture assessed by high resolution peripheral quantitative computed tomography in men and women from the Hertfordshire Cohort Study. **Bone**, v. 81, p. 145–151, 2015.

FIORE, M. S. H. di. **Atlas de histologia**. 7. ed. - Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2001. 229 p., il. color.

FORESTIER-ZHANG, L. & BISHOP, N. Bone strength in children: understanding basic bone biomechanics. **Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition**, v. 101, n. 1, p. 2–7, 2015.

FRASCINO, A. V.; MANTESO, A.; CORRÊA, L. & DEBONI, M. C. Z. Aqueous-ozone irrigation of bone monocortical wounds in hyperglycemic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 327–333, 2013.

FROST, H. M. From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 4, p. 398–419, 2001.

FRYE C. W.; SHMALBERG, J. W. & WAKSHLAG, J. J. Obesity, Exercise and Orthopedic Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.46, n.5, p.831-841, 2016.

FUKADA, E., & YASUDA, I. On the Piezoelectric Effect of Bone. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 12, n. 10, 1158–1162, 1957.

GAO, F.; LV, T.-R.; ZHOU, J.-C. & QIN, X.-D. Effects of obesity on the healing of bone fracture in mice. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2018.

GARCÍA-GUASCH, L.; CARO-VADILLO, A.; MANUBENS-GRAU, J.; CARRETÓN, E.; CAMACHO, A. A. & MONTOYA-ALONSO, J. A. Pulmonary function in obese vs non-obese cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 6, p. 494–499, 2014.

GERMAN, A. J. The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1940-1946, 2006.

GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. COX inhibitors and their effects on bone healing. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 3, n. 2, p. 131–136, 2004.

GHIMIRE, S.; MIRAMINI, S.; EDWARDS, G.; ROTNE, R.; XU, J.; EBELING, P. & ZHANG, L. The investigation of bone fracture healing under intramembranous and endochondral ossification. **Bone Reports**, v. 14, p. 1–11, 2021.

GRUEN, M. E.; MESSENGER, K. M.; THOMSON, A. E.; GRIFFITH, E. H.; ALDRICH, L. A.; VADEN, S., & LASCELLES, B. D. X. Evaluation of serum cytokines in cats with and

without degenerative joint disease and associated pain. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 183, p. 49–59, 2017.

HAO, Q.; LILLEFOSSE, H. H.; FJÆRE, E.; MYRMEL, L. S.; MIDTBØ, L. K.; JARLSBY, R. H.; MA, T.; JIA, B.; PETERSEN, R. K.; SONNE, S. B.; CHWALIBOG, A.; FRØYLAND, L.; LIASET, B.; KRISTIANSEN, K. & MADSEN, L. High-glycemic index carbohydrates abrogate the antiobesity effect of fish oil in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 9, p. 1097-1112, 2012.

HEATH, S. **Animal Welfare**, v. 3. Londres: Springer, 2005. p. 91–118.

HENEGER, J. R.; BIGLER, S. A.; HENEGER, L. K.; TYAGI, S. C. & HALL, J. E. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.12, p. 1211–1217, 2001.

HERNANDEZ, C. J.; MAJESKA, R. J. & SCHAFFLER, M. B. Osteocyte density in woven bone. **Bone**, v. 35, n. 5, p. 1095–1099, 2004.

HIMMERICH, H. & SHELDRIK, A. TNF- α and Ghrelin: Opposite Effects on Immune System, Metabolism and Mental Health. **Protein & Peptide Letters**, v. 17, n. 2, p. 186–196, 2010.

HIRT, P. A.; CASTILLO, D. E.; YOSIPOVITCH, G. & KERI, J. E. Skin changes in the obese patient. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 81, n. 5, p. 1037–1057, 2019.

HO-PHAM, L. T.; NGUYEN, U. D. T. & NGUYEN, T. V. Association Between Lean Mass, Fat Mass, and Bone Mineral Density: A Meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 1, p. 30–38, 2014.

IANNONE, F. & LAPADULA, G. Obesity and Inflammation – Targets for OA Therapy. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 586–598, 2010.

IIZUKA, K.; BRUICK, R. K.; LIANG, G.; HORTON, J. D. & UYEDA, K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p. 7281–7286, 2004.

JOHNSON, J.; AUSTIN, C. & BREUR, G. Incidence of Canine Appendicular Musculoskeletal Disorders in 16 Veterinary Teaching Hospitals from 1980 through 1989. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 7, n. 2, p. 56–69, 1994.

KARSENTY, G. & FERRON, M. The contribution of bone to whole-organism physiology. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 314–320, 2012.

KARSENTY, G., & OURY, F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 521–526, 2014.

KAYAL, R. A.; SIQUEIRA, M.; ALBLOWI, J.; MCLEAN, J.; KROTHAPALLI, N.; FAIBISH, D.; EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. & GRAVES, D. T. TNF- α mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis Through FOXO1. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1604–1615, 2010.

- KESSLER, J.; KOEBNICK, C.; SMITH, N. & ADAMS, A. Childhood Obesity Is Associated With Increased Risk of Most Lower Extremity Fractures. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 471, n. 4, p. 1199–1207, 2012.
- KIENZLE, E. & BERGLER, R. Human-Animal Relationship of Owners of Normal and Overweight Cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1947–1950, 2006.
- KIM, J.-E., HSIEH, M.-H., SONI, B. K., ZAYZAFOON, M., & ALLISON, D. B. Childhood obesity as a risk factor for bone fracture: A mechanistic study. **Obesity**, v. 21, n. 7, p. 1459–1466, 2013.
- KO, K. I.; COIMBRA, L. S.; TIAN, C.; ALBLOWI, J.; KAYAL, R. A.; EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C.; PIGNOLO, R. J. & GRAVES, D. T. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism. **Diabetologia**, v. 58, n. 3, p. 633–642, 2015.
- KON, T.; CHO, T.-J.; AIZAWA, T.; YAMAZAKI, M.; NOOH, N.; GRAVES, D.; GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 6, p. 1004–1014, 2001
- KÖNIG, H. E. & LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos – texto e atlas colorido**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 787 p.
- KURSAWE, R.; CAPRIO, S.; GIANNINI, C.; NARAYAN, D.; LIN, A.; D'ADAMO, E.; SHAW, M.; PIERPONT, B.; CUSHMAN, S. W. & SHULMAN, G. I. (). Decreased Transcription of ChREBP- α/β Isoforms in Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Adolescents with Prediabetes or Early Type 2 Diabetes: Associations With Insulin Resistance and Hyperglycemia. **Diabetes**, v. 62, n. 3, p. 837–844, 2012.
- LACERDA, D. R.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N. M.; FERREIRA, A. V. M.; MORAES, M. M.; BOELONI, J. N.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, M. C.; BARCELLOS, L. A. M.; RODRIGUES, L. O. C. & SOARES, D. D. (2014). Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 1, p. 44–56, 2015.
- LENNERZ, B. & LENNERZ, J. K. Food Addiction, High-Glycemic-Index Carbohydrates, and Obesity. **Clinical Chemistry**. v. 64, n. 1, p. 64–71, 2018.
- LEPPÄNEN, O. V.; SIEVÄNEN, H. & JÄRVINEN, T. L. N. Biomechanical testing in experimental bone interventions—May the power be with you. **Journal of Biomechanics**. v. 41, n. 8, p. 1623–1631, 2008.
- LI, Y.; CHEN, S.-K.; LI, L.; QIN, L.; WANG, X.-L. & LAI, Y.-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 3, n. 3, p. 95–104, 2015.
- LIM, H. Y.; IM, K. S.; KIM, N. H.; KIM, H. W.; SHIN, J. I. & SUR, J. H. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 3, p. 326–331, 2015.

- LIMA, D. C., SILVEIRA, S. A., HAIBARA, A. S., & COIMBRA, C. C. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, n. 4, p. 361–373, 2008.
- LINDER, D. & MUELLER, M. Pet Obesity Management. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 44, n. 4, p. 789–806, 2014.
- LOI, F.; CÓRDOVA, L. A.; PAJARINEN, J.; LIN, T.; YAO, Z. & GOODMAN, S. B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119–130, 2016.
- LOPES, D. L.; MARTINS-CRUZ, C.; OLIVEIRA, M. B. & MANO, J. F. Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. **Biomaterials**, 2018.
- LÓPEZ-GÓMEZ, J. J.; CASTRILLÓN, J. L. P. & ROMÁN, D. A. L. Impact of obesity on bone metabolism. **Endocrinología y Nutrición** (English Edition), v. 63, n. 10, p. 551–559, 2016.
- LUND, E. M.; ARMSTRONG P. J.; KIRK, C. A. & KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, p. 177–86, 2006.
- LUND, E. M.; ARMSTRONG P. J.; KIRK, C. A. & KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, p. 88–96. 2005.
- MADEIRA, E.; MAFORT, T. T.; MADEIRA, M.; GUEDES, E. P.; MOREIRA, R. O.; MENDONÇA, L. M. C.; LIMA, I. C. B.; PINHO, P. R. A.; LOPES, A. J. & FARIAS, M. L. F. Lean mass as a predictor of bone density and microarchitecture in adult obese individuals with metabolic syndrome. **Bone**, v. 59, p. 89–92, 2014.
- MAJIDINIA, M.; SADEGHPOUR, A. & YOUSEFI, B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2937–2948, 2017
- MARIOLANI, J. R. L.; SARAIVA, J. F.; BATISTA, N. A. & BELANGERO, W. D. Punch shear test for quantitative evaluation of bone defect repair in Wistar rat tibia. **Injury**, v. 52, p. 13–17, 2021.
- MARSHALL, W. G.; BOCKSTAHLER, B. A.; HULSE, D. A. & CARMICHAEL, S. A review of osteoarthritis and obesity: current understanding of the relationship and benefit of obesity treatment and prevention in the dog. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 22, n. 5, p. 339–345, 2009.
- MARSHALL, W. G.; HAZEWINKEL, H. A. W.; MULLEN, D.; MEYER, G.; BAERT, K. & CARMICHAEL, S. The effect of weight loss on lameness in obese dogs with osteoarthritis. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 3, p. 241–253, 2010.
- MARX, R. E. & GARG, A. K. Bone Structure, Metabolism, and Physiology. **Implant Dentistry**, v. 7, n. 4, p. 267–276, 1998.
- MCCARTHY, I. The Physiology of Bone Blood Flow: A Review. **The Journal of Bone and Joint Surgery** (American), v. 88, n. 2, p. 4-9, 2006.
- McKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. British Volume, v. 60-B, n. 2, p. 150–162, 1978.

- MOCCHI, M.; DOTTI, S.; BUE, M. D.; VILLA, R.; BARI, E.; PERTEGHELLA, S.; TORRE, M. L. & GROLLI, S. Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier? **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1453, 2020.
- MORGAN, E. F.; BARNES, G. L. & EINHORN, T. A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; NELSON, D. A. & ROSEN C. J. **Fundamentals of osteoporosis**, California, E.U.A, Elsevier, cap. 1, p. 1–2, 2010.
- NEVES, S. M. P.; PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A.; FONTES, R. S. & SANTANA, R. O. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Experimentação da FCF-IQ/USP**. Silvânia M. P. Neves (et al.) – São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p. il.
- NICOLL, R. G.; JACKSON, M. W.; KNIPP, B. S.; ZAGZEBSKI, J. A.; STEINBERG, H. & O'BRIEN, R. T. Quantitative ultrasonography of the liver in cats during obesity induction and dietary restriction. **Research in Veterinary Science**, v. 64, n. 1, p. 1–6, 1998.
- NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M. X.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOGNA, A. C. & NOVELLI FILHO, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 2007.
- OH, K. W.; LEE, W. Y.; RHEE, E. J.; BAEK, K. H.; YOON, K. H.; KANG, M. I.; YUN, E. J.; PARK, C. Y.; IHM, S. H.; CHOI, M. G.; YOO, H. J. & PARK, S. W. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. **Clinical Endocrinology**, v. 63, n. 2, p. 131–138, 2005.
- OKADA, Y., KOBAYASHI, M., SAWAMURA, M., & ARAI, T. Comparison of Visceral Fat Accumulation and Metabolome Markers among Cats of Varying BCS and Novel Classification of Feline Obesity and Metabolic Syndrome. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 1-9, 2017.
- OLIVEIRA, M. C.; MENEZES-GARCIA, Z.; HENRIQUES, M. C. C.; SORIANI, F. M.; PINHO, V.; FARIA, A. M. C.; SANTIAGO, A. F.; CARA, D. C.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. & FERREIRA, A. V. M. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, p. 1-11, 2013.
- OSTO M. & LUTZ, T.A. Translational value of animal models of obesity – Focus on dogs and cats. **European Journal of Pharmacology**, v.759, p.240-252, 2015.
- PERREN, S. M. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. British Volume, v. 84-B, n. 8, p. 1093–1110, 2002.
- PLANELL, J. A. **Bone Repair Biomaterials**. 1. ed. Woodhead Publishing, 2009. 496 p.
- RAFFAN, E. The big problem: battling companion animal obesity. **Veterinary Record**, v. 173, n. 12, p. 287–291, 2013.
- RANA, R. S.; WU, J. S. & EISENBERG, R. L. Periosteal Reaction. **American Journal of Roentgenology**, v. 193, n. 4, p. W259–W272, 2009.
- REECE, W. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, c2017. Cap. 50, p. 1284-1293.

- REILLY, J. J., METHVEN, E.; MCDOWELL, Z. C.; HACKING, B.; ALEXANDER, D.; STEWART, L. & KELNAR, C. J. H. Health consequences of obesity. **Archives of Disease in Childhood**, v. 88, n. 9, p. 748-752, 2003.
- RIBEIRO, C., CORREIA, D. M., RODRIGUES, I., GUARDÃO, L., GUIMARÃES, S., SOARES, R., & LANCEROS-MÉNDEZ, S. In vivo demonstration of the suitability of piezoelectric stimuli for bone reparation. **Materials Letters**, v. 209, p. 118–121, 2017.
- RIEGEL & GODBOLD Jr., **Laser therapy in Veterinary Medicine: Photobiomodulation**, 1. ed., Wiley-Blackwell, 472 p., 2017.
- ROACH, H. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. **Cell Biology International**, v. 18, n. 6, p. 617–628, 1994.
- ROBEY, P. G. Noncollagenous Bone Matrix Proteins. In: John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz and T. John Martin. **Principles of Bone Biology**, 3. ed., Academic Press, cap. 17, p. 335–349. 2008.
- ROCHEFORT, G. Y.; PALLU, S. & BENHAMOU, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 9, p. 1457–1469, 2010.
- RUTLEDGE, A. C. & ADELI, K. Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. 13-23. 2007.
- SABHANEY, V.; BOUTIS, K.; YANG, G.; BARRA, L.; TRIPATHI, R.; TRAN, T. T. & DOAN, Q. Bone Fractures in Children: Is There an Association with Obesity? **The Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 2, p. 313–318, 2014.
- SAKIYAMA, H.; WYNN, R. M.; LEE, W.-R.; FUKASAWA, M.; MIZUGUCHI, H.; GARDNER, K. H.; REPA, J. J. & UYEDA, K. Regulation of Nuclear Import/Export of Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24899-24908, 2008.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998, 211p.
- SANDOE, P.; PALMER, C.; CORR, S.; ASTRUP, A. & BJORNVAD, C. R. Canine and feline obesity: a One Health perspective. **Veterinary Record**, v.175, n.24, p.610-616, 2014.
- SAVVIDIS, C.; TOURNIS, S. & DEDE, A. D. Obesity and bone metabolism. **Hormones**, v. 17, n. 2, p. 205–217, 2018.
- SCARLETT, J.M. & DONOGHUE, S. Associations between body condition and disease in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, p. 1725–1731, 1998.
- SHELLER, E. L.; KHOURY, B.; MOLLER, K. L.; WEE, N. K.; KHANDAKER, S.; KOZLOFF, K. M.; ABRISHAMI, S. H.; ZAMARRON, B. F. & SINGER, K. Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss. **Frontiers in Endocrinology** (Lausanne), v.7, p.1-13, 2016.
- SHEWETZ, V.; PIEBER, T. & OBERMAYER-PIETSCH, B. The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. **European Journal of Endocrinology**, v.166, n.6, p.959-967, 2012.

- SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P. & LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: **The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology***, v. 19, n. 5, p. 459–466, 2008.
- SCHLEGEL, K. A.; LANG, F. J.; DONATH, K.; KULOW, J. T. & WILTFANG, J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. ***Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology***, v. 102, n. 1, p. 7–13, 2006.
- SEIDENBERG, A. B. & AN, Y. H. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? ***Pharmacological Research***, v. 50, n. 2, p. 151–156, 2004.
- SHAMOS, M. H., LAVINE, L. S., & SHAMOS, M. I. Piezoelectric Effect in Bone. ***Nature***, v. 197, n. 4862, p. 81–81, 1963.
- SHAPSES, S. A.; POP, L. C. & WANG, Y. Obesity is a concern for bone health with aging. ***Nutrition Research***, v. 39, p. 1–13, 2017.
- SHEARER, T. Musculoskeletal Disorders. ***Hospice and Palliative Care for Companion Animals***, p. 129–136. 2017.
- SMITH, B. M.; WAYS, J. A.; DERAEDT, S. J.; LANGENDERFER, K. M.; NESTOR, A. L.; LEE, S. J.; WELCH, M.; KHUDER, S. A.; CICILA, G. T. & ALLISON, D. C. Determination of a non-invasive model for predicting obesity in rats by discriminant function analysis. ***Journal of Surgical Research***, v. 137, n. 2, p. 314, 2007.
- TAMASHIRO, K. L. K.; TERRILLION, C. E., HYUN, J., KOENIG, J. I., & MORAN, T. H. Prenatal Stress or High-Fat Diet Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Rat Offspring. ***Diabetes***, v. 58, n. 5, p. 1116–1125, 2009.
- TAYLOR, E. D. Orthopedic Complications of Overweight in Children and Adolescents. ***Pediatrics***, v. 117, n. 6, p. 2167–2174, 2006.
- TJEERTES, E. E. K. M., HOEKS, S. S. E., BEKS, S. S. B. J. C., VALENTIJN, T. T. M., HOOFWIJK, A. A. G. M., & STOLKER, R. J. R. J. Obesity – a risk factor for postoperative complications in general surgery? ***BMC Anesthesiology***, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.
- TOBIN, A.-M.; AHERN, T.; ROGERS, S.; COLLINS, P.; O’SHEA, D. & KIRBY, B. The dermatological consequences of obesity. ***International Journal of Dermatology***, v. 52, n. 8, p. 927–932, 2013.
- TURNER, C. H. Biomechanics of Bone: Determinants of Skeletal Fragility and Bone Quality. ***Osteoporosis International***, v. 13, n. 2, p. 97–104, 2002.
- TZANAVARI, T.; GIANNOGONAS, P. & KARALIS, K. P. TNF- α and Obesity. ***TNF Pathophysiology***, p. 145–156, 2010.
- VASARHELYI, E. M. & MACDONALD, S. J. The influence of obesity on total joint arthroplasty. ***The Journal of Bone and Joint Surgery***. V. 94-B, p.100–102, 2012.
- VASCONCELLOS, R. S.; BORGES, N. C. & CARCIOFI, A. C. Obesidade em cães e gatos elaboração do plano diagnóstico e terapêutico. In. JERICÓ, M.M.; NETO, J.P.A.; KOGIKA, M.M. ***Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos***. Rio de Janeiro: Roca, 2015, cap.39, p.322-331.

VERNON, L.; KAPLAN, L. & HUANG, C-Y. C. Stem Cell Based Bone Tissue Engineering. In: TAL, H. **Bone Regeneration**, Rijeka, Croácia, InTech, cap. 1, p. 3–24. 2012.

WANG, Y.; BEYDOUN, M. A.; LIANG, L.; CABALLERO, B. & KUMANYIKA, S. K. Will all Americans become overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. **Obesity** (Silver Spring), v.16, p. 2323–2330, 2008.

WEETH, L. P. Other Risks/Possible Benefits of Obesity. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 5, p. 843–853, 2016.

WOLFF, J. 1892. **The Law of Bone Remodeling**. Tradução de Paul Maquet e Ronald Furlong, Berlin: Springer-Verlag, 1986. 126 p. (Título original: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin: A Hirschwald).

WU, A. C.; RAGGATT, L. J.; ALEXANDER, K. A. & PETTIT, A. R. Unraveling macrophage contributions to bone repair. **BoneKEY Reports**, v. 2, p. 1-7, 2013.

YEOMANS, M. R. Palatability and the Micro-structure of Feeding in Humans: the Appetizer Effect. **Appetite**, v. 27, n. 2, p. 119-133, 1996.

YUE, R.; ZHOU, B. O.; SHIMADA, I. S.; ZHAO, Z. & MORRISON, S. J. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating MesenchymalStromal Cells in Adult Bone Marrow. **Cell Stem Cell**, v.18, n.6, p. 782-796, 2016.

ANEXO I

**Uniube**Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-0112/2019

Uberaba, 16 dezembro de 2019.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 027/2019 relativo ao projeto intitulado **“Influência da obesidade na reparação óssea de ratos”** que tem como responsável **Prof. Endrigo Gabellini Leonel Alves**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 027/2019 related to the project entitled **“The influence of obesity on bone healing in rats”**, under the supervision of **Prof. Endrigo Gabellini Leonel Alves**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,

Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE

ANEXO II

Protocolo de preparo de dieta hipercalórica rica em carboidratos simples – 100 g (para indução da obesidade)

1. Triturar a ração comercial para roedores em um processador de alimentos;
2. Em balança de precisão de 0,5 g, pesar 40,0 g de ração comercial triturada, 40,0 g de leite condensado, 11,0 g de açúcar refinado e 9,0 g de água;
3. Misturar os ingredientes até formar uma massa úmida homogênea;
4. Formar bolos de 37,5 g por rato e servir.

Notas:

- i. A ração deve ser preparada diariamente, descartando-se as sobras.

ANEXO III

Protocolo de preparo de EDTA 10% (pH 7,4) – 1 litro (para descalcificação óssea)

1. Em uma proveta graduada, colocar aproximadamente 800 mL de água destilada ou de osmose reversa;
2. Em balança de precisão, pesar 100 g de EDTA tetrassódico;
3. Em um Becker, adicionar a água e o EDTA, e diluir completamente o soluto com um agitador magnético;
4. Com auxílio de um medidor de pH, corrigir o pH da solução para 7,4, adicionando ácido clorídrico (HCl) 37% quando básica, ou hidróxido de sódio (NaOH) sólido quando ácida;
5. Despejar a solução em uma proveta e completar com água destilada até atingir 1.000 mL.

Notas:

- i. Os ossos a serem descalcificados (previamente fixados em formalina tamponada a 10% por 48 horas e depois em álcool 70%) devem ser envolvidos em gaze e imersos na solução de EDTA 10% de maneira que não toquem as paredes do recipiente, permitindo que toda a superfície óssea fique em igual contato com a solução e possibilitando descalcificação uniforme.
- ii. A solução deve ser trocada diariamente ou em dias alternados.
- iii. O tempo para completa descalcificação é de 8 a 12 semanas.

ANEXO IV

Protocolo de preparo de PBS 1,5 molar – 1 litro

1. Em uma proveta, colocar aproximadamente 800 mL de água ultrapura;
2. Dissolver em água ultrapura com auxílio de um agitador magnético:
 - 80 g de cloreto de sódio (NaCl)
 - 2 g de cloreto de potássio (KCl)
 - 11,5 g de fosfato de sódio anidro (Na₂HPO₄)
 - 2 g de fosfato de potássio (KH₂PO₄)
3. Com auxílio de um medidor de pH, corrigir o pH da solução para 7,2, adicionando ácido clorídrico (HCl) 37% quando básica, ou hidróxido de sódio (NaOH) sólido quando ácida;
4. Despejar a solução em uma proveta e completar com água ultrapura até atingir 1.000 mL;
5. Transferir para frasco âmbar;
6. Armazenar a 4°C.

Notas:

- i. Dentro de alguns dias, quando eficientemente preparada, a solução formará cristais no fundo do frasco.
- ii. Para a utilização, descristalize a solução por imersão do frasco em água em temperatura ambiente ou em banho-maria a 30°C.

ANEXO V

Protocolo de preparo de PBS 0,15 molar – 1 litro

1. Em uma proveta, colocar 100 mL de PBS 1,5 molar e 900 mL de água ultrapura;
2. Transferir para frasco âmbar;
3. Armazenar a 4°C.

Notas:

- i. Esta solução é utilizada para armazenamento dos ossos após a descalcificação.

ANEXO VI

Inclusão de tecido ósseo em parafina

(para histomorfometria)

1. Lavar os cassetes identificados contendo o fragmento do tecido ósseo em água corrente por 10 minutos;
2. Em seguida, fazer cinco banhos em álcool absoluto em microondas por nove minutos na potência 20;
3. Colocar os cassetes para três banhos em xilol por 30 minutos cada, dentro de capela de exaustão de gases em temperatura ambiente;
4. Imergir cassetes em parafina fundida a 62°C em estufa por 60 a 90 minutos;
5. Por fim, emblocar os fragmentos em parafina, identificando-os.

Notas:

- i. Certificar-se que houve descalcificação completa dos ossos antes de começar o processo de inclusão em parafina.

ANEXO VII

Coloração em hematoxilina e eosina

(para histomorfometria)

1. Separar as lâminas em berço para coloração;
2. Desparafinizar a lâmina fazendo três banhos em xilol por cinco minutos cada;
3. Fazer três banhos em álcool absoluto por cinco minutos cada;
4. Fazer um banho em álcool 95% por cinco minutos;
5. Lavar em água corrente por cinco minutos;
6. Colocar na hematoxilina por 50 segundos;
7. Lavar em água corrente por cinco minutos;
8. Colocar na eosina por 50 segundos;
9. Fazer três banhos em álcool absoluto por cinco minutos cada;
10. Fazer três banhos em xilol por cinco minutos cada;
11. Colocar lamínula.

ANEXO VIII

Protocolo de determinação da composição óssea

Etapa 1 – Determinação da massa óssea orgânica

1. Pesar os ossos em balança de precisão de 0,005 g no momento da eutanásia, obtendo-se o valor da massa óssea, e posteriormente, envolvê-los em gaze embebida em solução salina estéril e congelá-los a -20 °C;
2. Colocar os ossos em crisois individuais e submetê-los a um período de 24 horas a 100°C em estufa para eliminação da umidade;
3. Pesar os ossos em balança de precisão de 0,005 g, fazendo-se a diferença com a massa óssea mineral (etapa 2) para determinação da massa óssea orgânica.

Etapa 2 – Determinação do conteúdo mineral

1. Colocar os ossos secos em crisois individuais e submetê-los a um período de 24 horas a 800°C em mufla para eliminação da matéria orgânica;
2. Pesar os ossos em balança de precisão de 0,005 g para determinação da massa óssea mineral;
3. Armazenar os ossos em microtubo tipo *Eppendorf*.

Notas:

- i. Entre um processo e outro, manter as amostras dentro da estufa, mufla ou de dessecador para evitar absorção da umidade ambiente.
- ii. Evitar o manejo das amostras em dias chuvosos.
- iii. Não abrir a mufla imediatamente após seu desligamento, aguardar 24 horas para perder a temperatura de forma gradual.