

Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas

Deepak Kumar Khajuria¹, Rema Razdan², D Roy Mahapatra³

RESUMO

Atualmente, os ratos são os animais de laboratório mais usados para investigar a osteoporose. Apresentamos um método eficiente de ooforectomia e o comparamos com dois outros comumente utilizados para indução experimental de osteoporose (incisão cutânea dorsal na linha média e abordagem dorsolateral dupla). Ratas Wistar de 12 semanas de idade foram divididas em três grupos. No grupo A, a ooforectomia foi precedida por uma única incisão cutânea dorsal na linha média de 3 cm de comprimento; no grupo B, por incisões dorsolaterais duplas de aproximadamente 1 cm de comprimento cada; e no grupo C, por uma única incisão ventral transversal de 0,4–0,6 cm na região abdominal média. Os pesos corporais médios dos animais nos grupos A, B e C foram $258,12 \pm 0,54$ g, $255,78 \pm 0,42$ g e $254,55 \pm 1,69$ g, respectivamente. Houve diferenças significativas quanto à duração (em minutos) da cirurgia nos grupos B ($9,65 \pm 0,86$) e C ($7,55 \pm 0,11$; $P < 0,001$) em comparação à do grupo A ($15,52 \pm 0,30$), e no grupo B ($P < 0,01$) em comparação à do grupo C. Os tempos de cicatrização da ferida (em dias) nos grupos B ($9,22 \pm 0,67$) e C ($8,01 \pm 0,93$) foram significativamente menores que aquele no grupo A ($11,58 \pm 1,2$; $P < 0,001$), sendo tal tempo no grupo C discretamente menor que no grupo B. A cirurgia, como conduzida no grupo C, foi tecnicamente mais fácil, consumiu menos tempo e apresentou cicatrização mais rápida de ferida.

Palavras-chave: ooforectomia, osteoporose pós-menopausa, modelos animais.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A compreensão da osteoporose pós-menopausa é comprometida pela dificuldade em se estudar uma doença restrita aos seres humanos. O uso de um modelo animal de osteoporose pós-menopausa fornece material experimental mais uniforme e permite a avaliação de potenciais terapias para a condição.¹ Para o estudo da osteoporose pós-menopausa, o uso de um modelo animal reduz os problemas associados ao estudo de doenças em seres humanos, tais como tempo e variabilidade comportamental em sujeitos de teste. Além disso, os estudos clínicos têm alto custo e requerem longos intervalos de tempo, o que é outra razão para explicar por que modelos animais desempenham um importante papel na pesquisa sobre osteoporose. Nos Estados Unidos, para

a avaliação pré-clínica de novos medicamentos, a Agência Norte-Americana Reguladora de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) requer informações provenientes de modelos animais.²

Os animais mais comumente utilizados na investigação da osteoporose são os ratos, pois não são caros, são de fácil alojamento, crescem rapidamente, estão largamente disponíveis, e o público geral está acostumado ao uso de roedores em pesquisa.³ A ooforectomia em ratas pode ser realizada de diferentes maneiras. A seleção da técnica operatória é muito importante, especialmente quando o número de animais for muito grande e a duração do experimento for curta. Há dois tipos principais de incisão usados para a realização de ooforectomia em ratas: a incisão cutânea única dorsal na linha média⁴ e incisões duplas dorsolaterais.⁵

Recebido em 26/07/2011. Aprovado, após revisão, em 05/03/2012. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse. Comitê de Ética: Comitê de Ética Animal Institucional do Al-Ameen College of Pharmacy.

Departamento de Farmacologia, Al-Ameen College of Pharmacy.

1. Mestre em Farmácia, Pesquisador, Departamento de Farmacologia, Al-Ameen College of Pharmacy

2. Doutor; Professor, Departamento de Farmacologia, Al-Ameen College of Pharmacy

3. Doutor; Professor-Assistente, Laboratory for Integrative Multiscale Engineering Materials and Systems, Departamento de Engenharia Aeroespacial, Indian Institute of Science

Correspondência para: Deepak Kumar Khajuria. Al-Ameen College of Pharmacy. Department of Pharmacology. Hosur Road, Bangalore, 560027. E-mail: deepak_kumarkhajuria@yahoo.co.in

Este estudo concentrou-se na criação de um método minimamente invasivo de ooforectomia, que pode ser útil para veterinários na prática privada ou em instituições de pesquisa como um modelo para indução experimental de osteoporose pós-menopausa em ratas. Além disso, comparamos nosso método novo e eficiente de ooforectomia com outros relatados em termos de duração do procedimento cirúrgico, grau de dificuldade da técnica operatória e acesso às gônadas, e tempo necessário para a cicatrização da ferida cirúrgica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Vinte e quatro ratas de laboratório Wistar saudáveis, com 12 semanas de idade, foram incluídas no estudo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ciclos claro/escuro de 12 horas. Elas receberam uma dieta padrão de laboratório (Amrut Rat and Mice Feed, Pranav Agro Industries Ltd., Sangli, Índia) sem restrição de água. Antes do experimento, aprovação ética foi obtida do Comitê de Ética Animal Institucional do Al-Ameen College of Pharmacy, Bangalore.

Procedimento cirúrgico: ooforectomia

Antes da cirurgia, o peso dos animais foi medido em uma balança digital. As ratas Wistar foram divididas em três grupos contendo oito animais cada um. Os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal (Neon Pharma, Mumbai e Indian Immunologicals Ltd., Hyderabad, respectivamente).⁶

No grupo A, a ooforectomia foi precedida por uma única incisão cutânea dorsal na linha média, com 3 cm de comprimento, entre a metade do dorso e a base da cauda, segundo o método descrito por Lasota *et al.*⁴ No grupo B, a ooforectomia foi feita com duas incisões dorsolaterais: uma incisão pequena (1,5 cm) foi feita na pele e na parede muscular em cada lado da coluna vertebral, na face dorsal, de acordo com o método descrito por Park *et al.*⁵ No grupo C, a operação foi realizada após a colocação do animal anestesiado em decúbito dorsal. O pelo do abdome da rata foi completamente removido com creme depilatório (Vee, Reckitt Benckiser, Índia).

A área da cirurgia foi limpa com etanol (Merck, Índia). Uma pequena incisão transversal peritoneal de 0,4–0,6 cm foi feita com bisturi cirúrgico (lâmina nº 11) na parte média do abdome, ligeiramente lateralizada para a direita, próxima ao segundo mamilo direito da rata, como mostrado na Figura 1.

Depois de acessar a cavidade peritoneal, o tecido adiposo foi afastado até que a trompa uterina esquerda e o ovário correspondente circundado por uma quantidade variável de gordura fossem identificados. O ovário direito e sua gordura foram localizados com facilidade e delicadamente exteriorizados. O procedimento foi repetido para o ovário esquerdo através da mesma incisão, como mostrado na Figura 2. A gordura periovariana e o ovário foram delicadamente afastados do local da incisão para evitar o desprendimento de um pequeno pedaço de ovário, que poderia então cair na cavidade abdominal, reimplantando-se e assumindo sua função normal.⁷ Após a identificação do ovário e dos cornos uterinos, realizou-se sutura trançada de seda (Ethicon mersilk sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltd., Índia) em torno da área dos cornos distais, havendo secção e remoção dos ovários, como mostra a Figura 3.

A área dos cornos uterinos foi retornada à cavidade peritoneal após a remoção dos ovários. O fechamento deu-se em duas camadas, muscular e cutânea, utilizando-se suturas estéreis. O peritônio e as camadas musculares foram suturadas com fio absorvível



Figura 1
Incisão transversal realizada na parte média do abdome, ligeiramente lateralizada para a direita, com lâmina de bisturi. O músculo transversal abdominal é exposto após incisão cutânea.



Figura 2
Após dissecação do músculo, o espaço peritoneal e o tecido adiposo em torno do ovário são expostos. Os círculos negros mostram os ovários circundados por tecido adiposo.



Figura 3

Ligação no corno uterino distal para a completa remoção dos ovários, um de cada vez. O círculo negro mostra ovário circundado por tecido adiposo completamente removido.

(Ethicon chromic sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltd., Índia), e a pele foi suturada com fio não absorvível (Ethicon mersilk sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltd., Índia). Iodopovidona foi aplicada na área para desinfetar a pele após a sutura. Alto grau de assepsia foi mantido durante todo o procedimento.

Após a cirurgia, as ratas foram alojadas individualmente em caixas de poliuretano por uma semana para que se recuperassem, quando então foram reagrupadas em suas gaiolas originais. Cuidados foram tomados, uma vez que a abordagem ventral em roedores implica que a ferida fique em contato direto quase constante com o forro do fundo da gaiola, podendo resultar em complicações mais frequentes na ferida. Assim, após a cirurgia, os animais foram alojados individualmente por uma semana em caixas de poliuretano, com forro limpo e seco feito com tecido de algodão 100% esterilizado para conforto extra e calor apropriado, evitando-se hipotermia e possível contaminação.

Avaliação da cicatrização da ferida

Para avaliar a cicatrização da ferida e sua duração, utilizou-se o comprimento absoluto e normalizado da ferida. O comprimento máximo foi obtido no segundo dia após a cirurgia e, daí por diante, medido a cada dois dias até que a cicatrização se completasse. A porcentagem de cicatrização ou valores normalizados foram calculados dividindo-se o comprimento máximo das feridas por aquela medida do segundo dia depois da cirurgia. A duração da cicatrização da ferida foi o tempo necessário para sua total contração. A porcentagem de cicatrização da ferida foi calculada usando-se a equação $[(L_2 - L_1)/L_2 \times 100]$, onde L_2 e L_1 são os comprimentos máximos da ferida no segundo dia e qualquer outro dia, respectivamente.⁸

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM). A comparação entre os diferentes grupos foi

feita com análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. Em todos os casos, uma probabilidade de erro inferior a 0,05 foi selecionada como o critério para significado estatístico.

RESULTADOS

Taxa de mortalidade

Não houve relato de morte relacionada ao procedimento no grupo B. Entretanto, dois animais no grupo A e um no grupo B morreram nos dois primeiros dias após a cirurgia. Assume-se que qualquer procedimento que causa dor em seres humanos causa também em animais. Sabe-se ainda que os procedimentos cirúrgicos causam dano tissular doloroso. Entretanto, nas incisões maiores que necessitam de mais suturas, tais como aquelas dos grupos A e B, os animais com frequência apresentam uma reação inflamatória aos fios absorvíveis. Além disso, leva-se mais tempo para fazer tais suturas. Essa pode ser a razão do aumento da taxa de mortalidade dos animais nos grupos A e B. Estudos bem-estabelecidos mostraram repetidamente que pequenas incisões abdominais transversais facilitam a locomoção, aumentam o apetite e reduzem o tempo de recuperação pós-operatória em seres humanos, roedores e coelhos, que são particularmente sensíveis a dor e inflamação.

Peso corporal

Antes da cirurgia, não houve diferença significativa no peso corporal das ratas entre os grupos. A Tabela 1 resume os efeitos da ooforectomia no peso corporal em todos os grupos. Não houve diferença significativa no peso corporal dos animais após a cirurgia nos três grupos.

Duração da cirurgia

A duração da cirurgia foi significativamente menor no grupo C ($7,55 \pm 0,11$ min) em relação aos grupos A ($15,52 \pm 0,30$ min, $P < 0,001$) e B ($9,65 \pm 0,86$ min, $P < 0,01$), como mostrado na Tabela 1. Além disso, no grupo B, a duração da cirurgia foi significativamente menor que no grupo A ($P < 0,001$).

Tempo de cicatrização da ferida

O tempo de cicatrização da ferida nos grupos B ($9,22 \pm 0,67$ dias) e C ($8,01 \pm 0,93$ dias) foi significativamente menor que aquele no grupo A ($11,58 \pm 1,2$ dias, $P < 0,001$), como mostrado na Tabela 1. No entanto, o tempo de cicatrização da ferida não diferiu significativamente entre os grupos C e B. As distribuições do comprimento da ferida e da porcentagem de cicatrização por dia variaram significativamente entre os grupos A e C. A variação do comprimento da ferida diferiu entre os três grupos (Figura 4).

Tabela 1
 Comparação dos diferentes procedimentos para ooforectomia em ratas

Grupos	Incisão	Peso corporal	Duração da cirurgia (min)	Tempo para cicatrização da ferida (dias)
Grupo A (n = 8)	Única dorsal na linha média, 3 cm de comprimento	258,12 ± 0,54	15,52 ± 0,30	11,58 ± 1,2
Grupo B (n = 8)	Duas dorso-laterais, cada uma com 1,5 cm de comprimento	255,78 ± 0,42	9,65 ± 0,86*	9,22 ± 0,67*
Grupo C (n = 8)	Abdominal transversal, 0,4–0,6 cm de comprimento	254,55 ± 1,69	7,55 ± 0,11**	8,01 ± 0,93*

Dados apresentados como média ± EPM (n = 6), avaliados pelo teste de Bonferroni. Todos os valores são média ± EPM (n = 8). *Comparação estatisticamente significativa com o grupo A (P < 0,001); **Comparação estatisticamente significativa com o grupo B (P < 0,01).

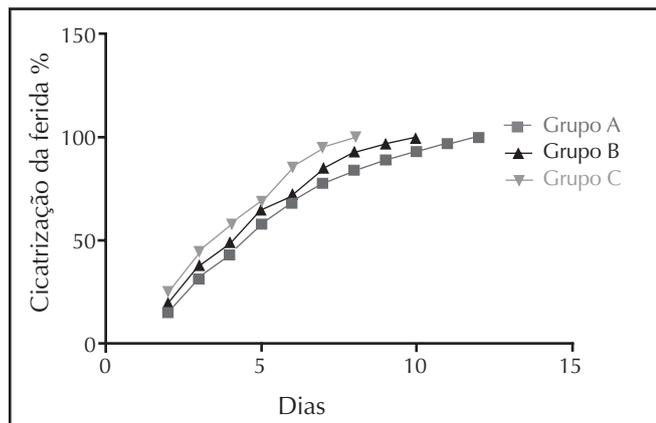


Figura 4
 Porcentagem de cicatrização da ferida por dia nos grupos A, B e C.

DISCUSSÃO

Os roedores constituem o modelo animal mais comumente usado para o estudo da osteoporose, porque depois da ooforectomia o esqueleto da rata é mais sensível à perda dos hormônios ovarianos, exibindo a maioria das características da osteoporose pós-menopausa humana. Portanto, para a avaliação preliminar de um novo agente farmacológico efetivo na osteoporose pós-menopausa, os roedores são, em geral, a espécie escolhida, seguindo-se a verificação em

outras espécies antes da realização de ensaios clínicos em seres humanos. Entretanto, até onde sabemos, o procedimento para a criação de um método eficiente de ooforectomia em ratas ainda não havia sido publicado. Assim, neste artigo, descrevemos uma nova abordagem para a criação de ooforectomia minimamente invasiva. Também comparamos nosso método com dois outros relatados anteriormente (incisão cutânea dorsal única na linha média e abordagem dorsolateral dupla).

Antes de realizar a incisão abdominal, o cirurgião precisa considerar múltiplos fatores, tais como área a ser exposta, exposição operatória, simplicidade, e necessidade de entrada rápida na cavidade abdominal. O fator mais importante é uma exposição adequada do campo operatório. Complicações durante a cirurgia podem ocorrer devido à exposição inadequada, que, em geral, resulta da falta de vontade do cirurgião de ampliar a incisão. Neste estudo, a duração da cirurgia foi significativamente menor no grupo C (incisão ventral transversal, 0,4–0,6 cm de comprimento) que nos grupos A (incisão cutânea dorsal única na linha média, 3 cm de comprimento) e B (incisões dorsolaterais duplas, cada uma com 1,5 cm de comprimento).

A seleção cuidadosa do local de incisão e o fechamento adequado da ferida após uma incisão abdominal são muito importantes para o sucesso da cirurgia.⁹ O tipo de incisão pode, no entanto, influenciar a ocorrência de complicações pós-operatórias da ferida. A pequena incisão transversal na região abdominal baseia-se em melhores princípios anatômicos e fisiológicos. As vantagens relatadas de incisões transversais para cirurgias abdominais incluem melhores resultados cosméticos, menos dor e baixa incidência de formação de hérnia.¹⁰

O tempo de cicatrização da ferida foi significativamente menor no grupo C em relação ao grupo A. Não foi observada diferença significativa no tempo de cicatrização da ferida entre os grupos C e B, embora esse tempo no grupo C tenha sido menor que o do grupo B. Os resultados relatados neste artigo sugerem a necessidade de incisão muscular precisa durante a ooforectomia, o que resulta em rápida localização dos ovários em ratas. Incisões musculares grandes ou dorsolaterais duplas podem levar a sangramento excessivo, requerendo o uso de mais suturas.

CONCLUSÃO

Ao comparar esses diferentes tipos de incisão para ooforectomia em ratas, sugere-se que o uso de uma incisão abdominal ventral transversal em lugar de uma incisão cutânea dorsal

única na linha média, ou incisões dorsolaterais duplas, possa influenciar parâmetros tais como duração da cirurgia e taxas de recuperação e complicação. A operação realizada no grupo C, quando comparada àquelas realizadas nos grupos A e B, mostrou-se tecnicamente mais fácil, consumiu menos tempo e apresentou cicatrização de ferida mais rápida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Al-Ameen College of Pharmacy, por fornecer as instalações para a condução da pesquisa.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

1. Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci* 1998; 3:c17–26.
2. Hartke JR. Preclinical development of agents for the treatment of osteoporosis. *Toxicol Pathol* 1999; 27(1):143–7.
3. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M *et al.* Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2(1):117–27.
4. Lasota A, Danowska-Klonowska D. Experimental osteoporosis – different methods of ovariectomy in female white rats. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004; 49(Suppl 1): 129–31.
5. Park SB, Lee YJ, Chung CK. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of double dorso-lateral approach. *J Korean Neurosurg Soc* 2010; 48(4):309–12.
6. Shirke SS, Jadhav SR, Jagtap AG. Methanolic extract of *Cuminum cyminum* inhibits ovariectomy-induced bone loss in rats. *Exp Biol Med* 2008; 233(11):1403–10.
7. Parhizkar S, Ibrahim R, Latiff LA. Incision choice in laparotomy: a comparison of two incision techniques in ovariectomy of rats. *World Apple Sci J* 2008; 4:537–40.
8. Bouzarjomehri F, Hajizade S, Sharafi AA, Firoozabadi SMP. Effects of low frequency pulsed electromagnetic fields on wound healing in rat skin. *Arch Iran Med* 2000; 3(1):23–7.
9. Burger JW, van 't Riet M, Jeekel J. Abdominal incisions: techniques and postoperative complications. *Scand J Surg* 2002; 91(4):315–21.
10. Grantcharov TP, Rosenberg J. Vertical compared with transverse incisions in abdominal surgery. *Eur J Surg* 2001; 167(4):260–7.