

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

FABIANO KUPCZIK

**INFLUÊNCIA DA CIPROFLOXACINA NA RESISTÊNCIA
DO CALO ÓSSEO DE FRATURAS PADRONIZADAS DE
FÊMURES DE RATOS**

CURITIBA

2008

FABIANO KUPCZIK

**INFLUÊNCIA DA CIPROFLOXACINA NA RESISTÊNCIA
DO CALO ÓSSEO DE FRATURAS PADRONIZADAS DE
FÊMURES DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Gomes Vialle

**CURITIBA
2008**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Vilson** e **Dilma**, simplesmente por tudo que me deram e fizeram para eu chegar até aqui.

Aos meus irmãos **Vanessa** e **Fabricio**, pelo incondicional apoio ao meu trabalho.

Aos meus sobrinhos **Lucas Eduardo** e **Maria Fernanda**, pela paciência na minha ausência em virtude das jornadas de estudo e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof.Dr. Luiz Roberto Gomes Vialle**, que me orientou neste trabalho e muito me ajudou em minha carreira profissional. A este mestre que sempre esteve à disposição e me orientou com sabedoria e dedicação, me incentivando do começo ao fim.

Aos acadêmicos **Lucas de Almeida Vieira** e **André Eugênio Omine Fernandes** e ao médico residente **Leonardo Oliveira Nobre**, que na humildade e nos esforços de seus trabalhos, muito me ensinaram.

A **Julio Cesar Francisco**, do Laboratório de Técnica Operatória da PUCPR, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos.

A **Rafael Zotz**, do Biotério Central da PUCPR, pelo auxílio nos cuidados com os animais.

A **Ricardo Torres**, do Laboratório de Ensaios Destrutivos da PUCPR, pelo auxílio no estudo biomecânico.

A **Prof^a. Márcia Olandoski**, pela importante análise estatística deste estudo.

A médica veterinária **Priscila Matsunaga Joaquim**, pelo auxílio na realização das radiografias.

A **Vanessa Kupczik**, pelo auxílio na edição das imagens e figuras.

Aos amigos **Marciano Anghinoni**, **Daniel Tenius**, **Marlus Schiavon**, **Lucio Ernlund**, **Leandro Vidigal**, **Renato Takimura**, **Marco Antonio Pedroni** e **Emiliano Vialle**, pelo constante incentivo ao meu trabalho.

A **Eduardo Novak** e **Anna Raquel Gomes**, pela ajuda na revisão deste estudo.

RESUMO

INTRODUÇÃO: as fraturas de fêmur podem evoluir com infecção local e à distância. A ciprofloxacina é um dos antibióticos utilizados nestas situações. Entretanto, um dos seus efeitos adversos é a condrotoxicidade. Como a consolidação óssea é um processo contínuo onde há a formação de calo mole com presença de células cartilaginosas na fase de reparação, a ciprofloxacina poderia alterar este processo. **OBJETIVO:** analisar a influência da ciprofloxacina na resistência do calo ósseo de fraturas de fêmures de ratos. **MÉTODOS:** vinte ratos Wistar adultos machos foram submetidos à fixação com fio de aço intramedular e à fratura padronizada de fêmur. Os ratos foram divididos em 2 grupos e, durante 6 semanas, administrou-se ciprofloxacina por via subcutânea na dose de 50 mg/kg num grupo (Cipro) e soro fisiológico no outro (Controle). Após este período, os ratos foram submetidos à eutanásia e os fêmures dos ratos foram radiografados para confirmação da consolidação. Dois ratos de cada grupo foram a óbito e dezesseis animais foram estudados. Os fêmures foram desarticulados e submetidos a testes biomecânicos de flexão de três pontos realizados por uma máquina universal de ensaios para avaliação da força de flexão do calo ósseo e do osso normal. Para comparação dos grupos em relação à força, foi usado o teste t de Student para amostras independentes. Para comparação do calo ósseo com o fêmur normal dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A avaliação da condição de normalidade da variável foi feita com o teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. **RESULTADOS:** as radiografias e a análise macroscópica demonstraram consolidação em todas as fraturas. Na comparação dos grupos, para o calo ósseo não foi encontrada diferença significativa ($p=0,601$). Para o fêmur normal, não foi encontrada diferença significativa ($p=0,054$). Para o grupo Controle, na comparação do calo ósseo com o fêmur normal foi encontrada diferença significativa ($p < 0,001$). Para o grupo Cipro, na comparação do calo ósseo com o fêmur normal foi encontrada diferença significativa ($p=0,002$). **CONCLUSÃO:** não houve diferença estatisticamente significativa na resistência do calo ósseo de fraturas padronizadas de fêmures de ratos após o uso da ciprofloxacina em comparação ao grupo controle.

PALAVRAS-CHAVES: Ciprofloxacina. Consolidação óssea. Fratura experimental.

ABSTRACT

INTRODUCTION: femoral fractures are associated with local and distant infections and ciprofloxacin is one of the most indicated antibiotics in these situations. However, chondrotoxicity is one of its adverse effects. Whereas the fracture healing is a continued process where chondrocytes are presented in the early repair phases, ciprofloxacin could change the healing fracture process. **OBJECTIVE:** to determine the influence of ciprofloxacin in the strength of fracture callus in rat femurs. **METHODS:** twenty male Wistar rats were undergone to intramedullary nailing fixation and to standardized femoral fracture. They were divided in two groups of ten animals each. In the study group, the rats were treated with 50 mg/kg of ciprofloxacin since de first day and continued for six weeks, while the control group was treated with saline solution. Two rats of each group died and sixteen animals were analyzed. After the euthanasia, the femurs were carried out to a radiographic and to a biomechanical study in a three point bending test machine to evaluate the strength of fracture callus and intact bone. The results were analyzed by Student t test for independent sample and for paired sample. The variance was analyzed by the Shapiro-Wilks test. Values of $p < 0.5$ indicated statistic significance. **RESULTS:** radiographic and macroscopy analysis showed that all fractures were healed. In the biomechanical analysis, the comparison of fracture callus between the groups showed no statistical difference ($p = 0.601$). For the intact femur, no statistical difference was revealed ($p = 0.054$). The comparison between intact and fractured femur in each group showed statistical difference for the control group ($p < 0.001$) and for the ciprofloxacin group ($p = 0.002$). **CONCLUSION:** there was no statistical difference in the strength of fracture callus in rat femurs after ciprofloxacin administration in comparison with the control group.

KEY-WORDS: Ciprofloxacin. Fracture healing. Experimental fracture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação do ensaio mecânico de três pontos.....	27
Figura 2 – Representação do ensaio de flexão de três pontos e de dobramento.....	28
Figura 3 – Tricotomia realizada na área para o acesso cirúrgico no joelho esquerdo do rato.....	30
Figura 4 – Orifício inicial com agulha no centro do intercôndilo do fêmur do rato.....	31
Figura 5 – Passagem do fio de aço no canal intramedular do fêmur do rato com auxílio do perfurador à bateria.....	31
Figura 6 – Exteriorização e dobramento do fio de aço adjacente ao fêmur proximal do rato.....	32
Figura 7 – Desenho esquemático do aparelho utilizado para confecção de fraturas padronizadas em fêmur de ratos.....	33
Figura 8 – Aparelho utilizado para confecção das fraturas padronizadas no fêmur dos ratos.....	34
Figura 9 – Posicionamento do rato no aparelho no momento da confecção da fratura na diáfise do fêmur.....	34
Figura 10 – Radiografia pós-operatória imediata confirmando a fratura na diáfise do fêmur e o posicionamento intramedular do fio de aço.....	35
Figura 11 – Peças anatômicas do fêmur fraturado e do fêmur não fraturado após a desarticulação do animal.....	37
Figura 12 – Máquina universal de ensaios conectada ao computador.....	38
Figura 13 – Ensaio mecânico de três pontos no calo ósseo do fêmur do rato.....	39
Figura 14 – Radiografia final das peças anatômicas do grupo Controle demonstrando consolidação óssea em todos os ossos.....	41
Figura 15 – Radiografia final das peças anatômicas do grupo Cipro demonstrando consolidação óssea em todos os ossos.....	42

Gráfico 1 – Comparativo entre as médias e os desvios padrões da resistência do calo ósseo e do fêmur normal nos grupos Cipro e Controle.....	44
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da resistência do calo ósseo e do fêmur normal nos ensaios biomecânicos nos grupos Cipro e Controle após 6 semanas da fratura.....	43
Tabela 2 – Resultados das médias, medianas, valores mínimos e máximos e desvios padrões da resistência do calo ósseo nos ensaios biomecânicos nos grupos Cipro e Controle após 6 semanas da fratura.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM HUMANOS.....	15
3.2 COMPLICAÇÕES DAS FRATURAS DIAFISÁRIAS DE FÊMUR.....	16
3.3 DROGAS QUE INFLUENCIAM NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA.....	18
3.4 CIPROFLOXACINA.....	20
3.5 PADRONIZAÇÃO DAS FRATURAS EXPERIMENTAIS.....	23
3.5.1 Fixação das fraturas experimentais	24
3.6 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM RATOS.....	24
3.6.1 Estudos biomecânicos em ratos	25
3.7 ENSAIO MECÂNICO DE TRÊS PONTOS.....	27
4. MÉTODOS	29
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	29
4.1.1 Caracterização da amostra	29
4.1.2 Ambiente da experimentação	29
4.2 ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	30
4.2.1 Anestesia	30
4.2.2 Procedimento cirúrgico: fixação intramedular do fêmur	30
4.2.3 Fraturas padronizadas do fêmur	32
4.2.4 Radiografia pós-operatória	35
4.2.5 Pós-operatório	35
4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	36
4.4 EUTANÁSIA.....	36
4.5 PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS.....	36
4.6 ENSAIOS BIOMECÂNICOS.....	37
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	53

REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICE.....	60

1. INTRODUÇÃO

As fraturas dos ossos longos nos membros inferiores são muito comuns no trauma ortopédico. As fraturas diafisárias do fêmur apresentam incidência anual de 1 a 4:10.000 pessoas.⁽¹⁾ Elas ocorrem principalmente em pacientes abaixo de 40 anos devido a traumas de alta energia decorrentes de acidentes com veículos automotores. Conseqüentemente, acarretam numa morbidade muito grande nestes pacientes, pois resultam em períodos longos de hospitalização e de reabilitação.⁽²⁾

As fraturas do fêmur podem ser fechadas ou expostas e seu tratamento é predominantemente cirúrgico por meio de fixação interna ou externa, que proporcionam a estabilidade necessária para a consolidação óssea. Atualmente, o método preferencial de estabilização é a haste intramedular bloqueada, pois possibilita menor agressão às partes moles e mantém o alinhamento e o comprimento do osso, favorecendo a consolidação. Nas fraturas expostas, os métodos de fixação externa são usados mais comumente.^(2,3)

As fraturas do fêmur podem evoluir com complicações sistêmicas e locais. Dentre as sistêmicas, ocorrem: trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, embolia gordurosa, pneumonia e choque. Quanto as locais, ocorrem: infecção, retardo de consolidação, pseudoartrose e mais raramente síndrome compartimental. Dentre essas, a infecção é uma das mais temíveis, principalmente nas fraturas expostas, pois retarda a consolidação óssea e implica novos procedimentos cirúrgicos, maior tempo de internamento hospitalar e uso prolongado de antibióticos, adiando ainda mais o retorno do paciente à vida cotidiana.^(2,4,5)

Como muitos destes pacientes apresentam múltiplos traumatismos, tanto a reabilitação hospitalar quanto a domiciliar são prolongadas. Nesse período, é rotineiro o uso de fármacos analgésicos, antiinflamatórios, anticoagulantes e antibióticos para prevenir ou tratar complicações e dor. Entretanto, a utilização destas drogas pode influenciar na consolidação da fratura.

Alguns estudos experimentais com relação à interferência de fármacos no processo de consolidação óssea têm sido realizados. Dentre as drogas que apresentaram retardo na consolidação, estão os antiinflamatórios como o

tenoxicam ⁽⁶⁾, a hidrocortisona ⁽⁷⁾ e o diclofenaco sódico ⁽⁸⁾. Por outro lado, o acetaminofen não alterou o processo de consolidação ⁽⁹⁾ e o risendronato sódico interferiu positivamente ⁽¹⁰⁾. A enoxaparina interferiu positivamente num estudo ⁽¹¹⁾ e não interferiu em outros. ^(12,13)

O uso de antibióticos no tratamento das fraturas do fêmur é indicado tanto na profilaxia quanto no tratamento adjuvante da osteomielite, sendo que a ciprofloxacina é um dos antibióticos usados nestes casos. Além disso, é usada concomitantemente no tratamento de infecções nos locais dos pinos de fixadores externos e infecções à distância (ex: infecções do trato gênito-urinário e gastroenterites) e sua utilização é cada vez mais freqüente na prática diária. ^(14,15,16,17,18,19,20,21)

A ciprofloxacina é um antibiótico bactericida da classe das quinolonas de segunda geração. Exerce sua atividade microbiológica principalmente em germes gram-negativos, patógenos atípicos e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo indicada, além das situações citadas acima, em doenças sexualmente transmissíveis e infecções hospitalares. Dentre os efeitos adversos, os mais comuns ocorrem no sistema gastrointestinal e no sistema nervoso central. ⁽²²⁾

Efeitos adversos têm sido descritos também no sistema músculo-esquelético. Nos tendões, ocorrem alterações degenerativas que podem evoluir com rupturas espontâneas em idosos. Nas cartilagens articular e de crescimento, alterações nos condrócitos como morte celular e degeneração da matriz com conseqüente alteração na produção de colágeno foram demonstradas tanto *in vitro* quanto *in vivo* por vários estudos. ^(23,24,25,26,27,28,29)

A consolidação óssea é um processo contínuo que pode ser dividido em três fases: inflamação, reparação e remodelação. A fase inflamatória é rápida e inicia logo após a lesão, pois o sangramento da fratura cria um hematoma que serve de arcabouço para a migração de células inflamatórias que retirarão as células necróticas. A reparação inicia imediatamente após, havendo neovascularização e migração de células mesenquimais e fibroblastos que substituirão as células necróticas e iniciarão a formação do calo mole através de ossificação endocondral e intramembranosa. ^(5,30) É nesta fase que a ciprofloxacina atua devido à presença de células cartilaginosas. ⁽³¹⁾

Para a avaliação da consolidação óssea em fraturas experimentais, inicialmente, é necessário um modelo simples, adequado e padronizado de

produção de fraturas em modelos experimentais, como foi descrito por Bonnarens e Einhorn (1984) e, no nosso meio, por Vialle *et al* (2004).^(32,33) Após esta etapa, a análise pode ser realizada por meio de histologia, radiologia, imunohistoquímica e biomecânica. Destes, a radiologia é o método mais pareável para validação em seres humanos.

Quanto à biomecânica, o estudo da resistência do calo ósseo em fraturas de fêmur é importante, pois este deve ser resistente o suficiente às forças mecânicas deformantes para que ocorra a consolidação.⁽³⁴⁾ Como a força de flexão é uma das forças que desestabilizam as fraturas, foi considerada a possibilidade de avaliar biomecanicamente a resistência do calo ósseo de fraturas padronizadas de fêmur de ratos utilizando-se a força de flexão após o uso da ciprofloxacina.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da ciprofloxacina na consolidação de fraturas padronizadas de fêmures de ratos por meio da análise da força de flexão do calo ósseo realizada em ensaio biomecânico de três pontos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM HUMANOS

O osso é um tecido músculo-esquelético que possui células mesenquimais inclusas em uma matriz extracelular abundante contendo mineral. Esta matriz confere ao tecido grande resistência e rigidez sob forças de compressão e angulação e o colágeno tipo I presente na matriz dá a resistência em tensão. Há duas formas de tecido ósseo: cortical e esponjoso. A diáfise dos ossos longos consiste praticamente de osso cortical enquanto a metáfise apresenta osso esponjoso com uma fina camada de cortical, o que acarreta em diferenças na consolidação. ⁽⁵⁾

A consolidação óssea inicia-se após uma fratura que dá início a um processo dinâmico e seqüencial dividido em três fases: inflamação, reparação e remodelação. A fase inflamatória inicia-se logo após a fratura, onde ocorre lesão não só do osso, mas também dos tecidos moles circunjacentes, como o perióstio e o músculo. O hematoma que se forma no local propicia um meio para o qual as células inflamatórias migram e retiram as células mortas. Mediadores inflamatórios e fatores de crescimento são liberados, promovendo o aparecimento de células mesenquimais, fibroblastos e osteoprogenitoras e um tecido de granulação é formado ao redor das extremidades da fratura. ⁽⁵⁾

À medida que a inflamação regride, a fase de reparação inicia-se com a liberação de fatores de crescimento da angiogênese, sendo que os vasos periósticos contribuem com a maioria dos brotos capilares numa fase inicial. As células mesenquimais proliferam, diferenciam-se e produzem o calo ósseo, que consiste em tecido fibroso, cartilaginoso e osso. O osso formado inicialmente na periferia da reação inflamatória por formação intramembranosa é chamado calo duro; enquanto o tecido formado na região central é principalmente cartilaginoso e é chamado calo mole. O tecido ósseo gradualmente substitui o cartilaginoso através de ossificação endocondral, aumentando o calo duro e a estabilidade dos fragmentos da fratura. Este processo continua até que o osso novo una em ponte a fratura e restabeleça a continuidade das extremidades do osso cortical. Nesta

fase, o calo ósseo é imaturo e só ganhará resistência completa na remodelação. (5,30)

A remodelação óssea inicia-se durante a fase de reparação e continua durante anos após a consolidação e permite que o osso readquira sua forma e configuração normais conforme as forças e as cargas pelas quais é submetido. O resultado final deste processo é que, mesmo não tendo retornado à forma original, o osso foi alterado para exercer sua função. (5,30)

O processo de cura das fraturas pode ser influenciado por vários fatores como tipo e intensidade do trauma, lesões associadas, idade do paciente, estado nutricional e doenças associadas. Quanto ao tipo e à intensidade, lesões contusas e expostas devido a traumas de alta energia danificam mais os tecidos e dificultam a reparação. Lesões musculares, tendinosas e cartilaginosas se curam com tecido cicatricial, enquanto o osso se forma novamente. Como há importante interação célula-matricial entre estes tecidos, a cura óssea pode ser influenciada. A cicatrização também é influenciada pela idade do paciente, pois na criança a reparação é mais rápida que no adulto jovem, que por sua vez é mais rápida que no idoso. Em relação ao aspecto nutricional, como na cicatrização há migração e proliferação de células e produção de colágeno, proteoglicanos e outras macromoléculas, há a necessidade de um fornecimento constante de carboidratos e proteínas. Por isso, pacientes com algum grau de desnutrição e deficiência alimentar podem ter sua cicatrização afetada. Outras doenças e seus tratamentos clínicos associados podem interferir negativamente na cicatrização como diabetes, osteoporose, hipotireoidismo, insuficiência renal e infecções. Além disso, o tabagismo também influencia negativamente na cicatrização. (5,30)

3.2 COMPLICAÇÕES DAS FRATURAS DIAFISÁRIAS DE FÊMUR

As fraturas diafisárias de fêmur podem evoluir com complicações locais e sistêmicas que ocorrem tanto em lesões isoladas quanto em politraumatismos.

As complicações sistêmicas mais comuns são choque hipovolêmico, trombose venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP), embolia gordurosa, pneumomia e infecção urinária. O choque hipovolêmico é um tipo de

choque comum em uma fratura diafisária de fêmur, pois ela pode apresentar uma perda sanguínea de 1 a 2 litros. A estabilização da fratura e a reposição de volume são fundamentais no tratamento precoce. A TVP e o TEP podem ocorrer principalmente em pacientes politraumatizados e que ficam imobilizados e acamados por muito tempo. Entre 35 a 50% dos pacientes com fraturas do membro inferior desenvolvem TVP e 10% destes pacientes correm o risco de TEP, sendo que 2% morrem se a profilaxia adequada não for empregada. A embolia gordurosa ocorre em 3 a 4% dos pacientes com fraturas em ossos longos nas primeiras 72 horas do trauma, sendo fatal em 10 a 15% dos casos. A estabilização precoce da fratura diminui a ocorrência desta complicação. Pneumonias por aspiração podem ocorrer em pacientes acamados, idosos, com alteração do nível de consciência e diminuição da motilidade gastrointestinal. Da mesma forma, infecções do trato gênito-urinário também ocorrem nestes pacientes, sendo a infecção nosocomial mais freqüente (6 a 8%). O tratamento com antibióticos específicos deve ser efetuado em ambos os casos. ^(5,30)

As complicações locais mais comuns são retardo de consolidação, pseudoartrose, infecção da ferida cirúrgica, síndrome compartimental e infecção do foco da fratura. O retardo de consolidação e a pseudoartrose ocorrem devido a fraturas expostas com lesão de partes moles, principalmente do periósteo, dissecação cirúrgica extensa, estabilização insuficiente, grande distância entre os fragmentos ósseos e infecção. O retardo deve ser tratado conforme a sua causa enquanto a pseudoartrose geralmente exige tratamento cirúrgico. Infecções da ferida cirúrgica devem ser tratadas com desbridamento cirúrgico e uso de antibióticos específicos. A infecção do foco da fratura ocorre devido a lesões expostas e a dissecação extensa dos tecidos moles ao redor e também deve ser tratada com desbridamento cirúrgico, retirada ou troca de material de síntese e antibioticoterapia. Atualmente, as bactérias mais comuns que causam infecção óssea são gram-positivas e negativas e flora mista. O uso de antibióticos específicos deve ser rigoroso e por tempo prolongado. ^(5,30)

3.3 DROGAS QUE INFLUENCIAM NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

A consolidação óssea pode ser influenciada por diversas drogas utilizadas na prática clínica e estudos experimentais têm sido realizados para avaliar a influência destas substâncias no processo de consolidação óssea. (6,7,8,9,10,11,12,13,31,35,36,37)

Oliveira (2003) estudou o efeito do risendronato sódico na consolidação de fraturas de tíbia em ratos nutridos e desnutridos. Após avaliação da evolução ponderal, do aspecto radiográfico, densitométrico e histomorfométrico do calo ósseo concluiu que houve interferência positiva desta droga na consolidação. ⁽¹⁰⁾

Giordano *et al* (1999) avaliaram radiograficamente e histologicamente a consolidação de fraturas de tíbia não fixadas em ratos com uso de anticoagulante enoxaparina via subcutânea. Concluíram que a enoxaparina estimulou a formação do calo ósseo. ⁽¹¹⁾

Curcelli *et al* (2005), entretanto, concluíram após avaliação clínica, anatomopatológica e biomecânica que os anticoagulantes enoxaparina e heparina sódica não interferiram na consolidação óssea de tíbia não fixadas em ratos. ⁽¹²⁾

Mussi Filho *et al* (2006), num estudo realizado na linha de pesquisa de trauma do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da PUCPR, também concluíram que o anticoagulante enoxaparina em doses terapêuticas não alterou o processo de consolidação óssea após análise histológica e macroscópica do calo ósseo de fraturas de fêmur fixadas em ratos. ⁽¹³⁾

Castro *et al* (2005) estudaram o efeito do analgésico acetaminofen em doses terapêuticas em fraturas de tíbia não fixadas em ratos. Após avaliação radiográfica e histológica, concluíram que não houve alteração na consolidação óssea. ⁽⁹⁾

Altman *et al* (1995) avaliaram os efeitos de duas drogas antiinflamatórias não-hormonais (ibuprofeno e indometacina) na consolidação de fraturas em ratos e concluíram que ambas retardaram o processo. ⁽³⁵⁾

Giordano *et al* (1999) estudaram a influência do antiinflamatório tenoxicam em doses terapêuticas e acima destas na consolidação de fraturas de tíbia não fixadas em ratos. Após avaliação histológica, concluíram que ambas as dosagens

retardaram o processo em relação direta com a dose utilizada. ⁽⁶⁾

Mendes *et al* (2001) estudaram a influência do uso prolongado de altas doses do antiinflamatório hormonal hidrocortisona em fraturas de tíbia não fixadas em ratos e concluíram, após análise histológica e radiológica, que esta droga diminuiu o hematoma, limitou a fase inflamatória e retardou a consolidação óssea. ⁽⁷⁾

Muller *et al* (2004) avaliaram os efeitos do antiinflamatório não-hormonal diclofenaco sódico na consolidação de fraturas de tíbia em ratos. Após análise clínica e biomecânica, concluíram que esta droga retardou a maturação do calo ósseo e diminuiu a rigidez do osso intacto. ⁽⁸⁾

Haleem *et al* (2004) avaliaram os efeitos dos antibióticos aminoglicosídeos gentamicina e vancomimicina na consolidação óssea de fêmur de ratos e concluíram após estudo biomecânico que estas drogas não alteraram a resistência do calo ósseo. ⁽³⁶⁾

Huddleston *et al* (2000), devido aos efeitos adversos na cartilagem de crescimento e ossificação endocondral em crianças e aos casos de retardo de consolidação e pseudoartrose observados na prática clínica, foram os primeiros a estudar os efeitos do antibiótico ciprofloxacina em dosagem terapêutica na consolidação óssea de fraturas experimentais em ratos. Os autores avaliaram 60 ratos Wistar machos e dividiram em 3 grupos, sendo um grupo tratado com ciprofloxacina, um com cefazolina e o último foi o controle. Cada grupo foi dividido em 4 subgrupos com 5 ratos cada para realização de análises histológica, radiológica, biomecânica e ultra-estrutural. Nos resultados, não houve diferença estatística nas análises biomecânica e radiológica entre os grupos tratados com ciprofloxacina e cefazolina, mas houve entre o grupo controle e o grupo da ciprofloxacina. Concluíram que houve retardo na consolidação óssea com o uso de concentrações terapêuticas da ciprofloxacina. ⁽³¹⁾

Tuncay, Ozbek, Kosem e Unal (2005) dividiram 25 ratos em 5 grupos e analisaram histopatologicamente a influência das quinolonas norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina e ciprofloxacina na consolidação óssea. Compararam com o grupo controle que não recebeu nenhuma droga e encontraram diferenças estatisticamente significantes em todos os grupos, com exceção da norfloxacina. Concluíram que todas as quinolonas retardaram a consolidação óssea em ratos. ⁽³⁷⁾

3.4 CIPROFLOXACINA

A ciprofloxacina é um antibiótico bactericida da classe II das quinolonas de segunda geração. Seu mecanismo de ação é inibir a síntese do DNA através da clivagem do DNA bacteriano no complexo DNA-enzima da DNA girase e da topoisomerase tipo IV, o que resulta numa rápida morte bacteriana. Possui boa absorção tanto por via oral quanto parenteral, o que permite rápida transição em casos de continuidade do tratamento após alta hospitalar. Sua ação inicia após uma a duas horas e apresenta meia-vida de 1,5 a 16 horas e, por isso, sua administração é feita uma a duas vezes ao dia. Apresenta boa penetração tecidual e celular, onde sua concentração é maior que a plasmática, e a concentração no osso é excelente e muitas vezes superior à concentração inibitória mínima. Sua eliminação ocorre predominantemente pelas vias renal e hepática e, por isso, a dosagem deve ser regulada em pacientes com insuficiência destes órgãos. ^(17,22)

A atividade microbiológica da ciprofloxacina é exercida principalmente em germes gram-negativos, enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, patógenos atípicos e alguns germes gram-positivos. Clinicamente, é indicada em infecções do trato gênito-urinário e relacionadas com uso de cateter, gastroenterites, prostatites, infecções hospitalares, doenças sexualmente transmissíveis e pneumonias atípicas. Em crianças, tem sido utilizada nas crises agudas da fibrose cística. ^(17,22) No sistema músculo-esquelético, é indicada e segura em osteomielites e infecções protéticas causadas por germes sensíveis, devendo ser usada pelo período de seis semanas a alguns meses. ^(14,15,16,17,19) Em fraturas expostas, o uso profilático pode ser indicado em lesões de baixa e média energia e em lesões por projéteis de arma de fogo. ^(18,20) Pavoni *et al* (2002) referem que a associação de ciprofloxacina com rifampicina pode ser usada no tratamento das infecções ósseas relacionadas com material de síntese utilizado nas fratura sem a necessidade de retirada do material. ⁽²¹⁾

Entretanto, vários efeitos adversos podem ocorrer com o uso da ciprofloxacina. Os efeitos que acontecem nos sistemas gastrointestinal e nervoso central são os mais frequentes, afetando de 2 a 20% dos pacientes. No sistema gastrointestinal, os sintomas mais comuns são diarreia, náuseas, vômitos e dor

abdominal. No sistema nervoso central, são comuns cefaléia, confusão, insônia, fadiga, tremores, sonolência e depressão. A patogênese no sistema nervoso central é desconhecida. Outros efeitos que podem ocorrer são reações alérgicas cutâneas, prurido, fotossensibilidade e alongamento do intervalo QT. ^(18,22,25,28)

No sistema músculo-esquelético, tendinopatias e rupturas tendinosas podem ocorrer após tratamento com ciprofloxacina por dias a meses, sendo mais freqüentes no tendão calcâneo onde a bilateralidade é de 50% dos casos e 70% acometem pacientes acima de 60 anos de idade. ^(18,22,25,28) Uma hipótese sobre o mecanismo de ação seria a quelação de magnésio que alteraria as proteínas dos tendões, principalmente o colágeno, a elastina e a fibronectina. ^(25,28)

Além disso, a condrotoxicidade é outro efeito adverso no sistema músculo-esquelético. Ingham *et al* (1977) foram os primeiros a relatar alterações de marcha e efeitos condrotóxicos em cachorros jovens devido ao uso de quinolonas. Desde então, outros estudos foram realizados para avaliar os efeitos da ciprofloxacina na cartilagem e o uso da ciprofloxacina foi contra-indicado em crianças e gestantes. ⁽²³⁾

Mont *et al* (1996), num estudo com cultura de condrócitos humanos tratados com ciprofloxacina, concluíram que houve alteração da proliferação celular através da inibição da síntese de DNA, sugerindo que esta droga teria efeito diferencial nas novas células de diferenciação e isto contra-indicaria o uso em crianças. ⁽²⁴⁾

Menschik *et al* (1997) estudaram os efeitos da ciprofloxacina e da ofloxacina em culturas de cartilagem humana de adultos e observaram morte dos condrócitos principalmente nas camadas profundas da cartilagem articular. Também, sugeriram que os mecanismos moleculares responsáveis pela condrotoxicidade incluiriam a deficiência de magnésio, inibição da desidrogenase mitocondrial e da síntese de preteoglicanos, alteração do metabolismo do DNA e acúmulo de fluoridos nos tecidos. Concluíram que poderia ocorrer uma aceleração da degeneração articular com o uso prolongado destas drogas. ⁽³⁸⁾

Stahlmann e Lode (1999), numa revisão sobre a toxicidade das quinolonas, referiram que o efeito tóxico na cartilagem articular imatura ocorreu em todas as espécies estudadas e que, na cartilagem articular do adulto, os efeitos são menos sensíveis. Relataram que a reversibilidade dos efeitos tóxicos é desconhecida e que as quinolonas também afetaram a cartilagem de crescimento em animais

jovens. Além disso, a quelação de magnésio na cartilagem articular seria o provável mecanismo crucial da condrotoxicidade, o que levaria às subseqüentes reações, inclusive a formação de radicais que induziriam às lesões da cartilagem. (25)

Multhaupt *et al* (2001), num estudo *in vitro* e *in vivo* com condrócitos normais e condrosarcomas humanos tratados com ciprofloxacina, concluíram que esta quinolona foi tóxica aos condrócitos em ambos os casos. (27)

Stahlmann (2002) referiu que as quinolonas têm efeito tóxico na cartilagem articular e na placa de crescimento e, por isso, seu uso em crianças deve ser restrito à fibrose cística. Também, relatou que alterações ultra-estruturais foram encontradas em tenócitos de animais tratados com dieta deficiente em magnésio, sugerindo uma correlação entre a patofisiologia das lesões na cartilagem e nos tendões. (28)

Li, Cheng, Chen e Wang (2004), num estudo *in vitro* e *in vivo* após administração de ciprofloxacina em ratos jovens, observaram inibição da proliferação dos condrócitos e da secreção de proteoglicanos. Também referiram que a quelação de magnésio seria o mecanismo da condrotoxicidade, resultando numa alteração dos receptores de superfície dos condrócitos. Concluíram que um tratamento adicional com magnésio poderia reduzir os efeitos adversos da ciprofloxacina na cartilagem. (29)

Entretanto, alguns estudos mostraram que crianças com fibrose cística tratadas com ciprofloxacina por períodos longos não apresentaram alterações macroscópicas na cartilagem articular em radiografias simples e ressonância nuclear magnética. (39,40)

Também, Stahlmann *et al* (2000) estudou a condrotoxicidade da ciprofloxacina em cachorros jovens através de análise imuno-histoquímica, de microscopia eletrônica e de concentrações plasmáticas e concluíram que a ciprofloxacina apresentou baixa condrotoxicidade, sendo mais tóxica em doses altas. Com isso, fizeram uma correlação com os achados em humanos, onde a ciprofloxacina parece ter menos condrotoxicidade que a pefloxacina e outras quinolonas. Porém, alertaram que não se deve concluir que, devido à experiência favorável com ciprofloxacina em crianças com fibrose cística, não haveria risco de condropatia no adulto. (26)

Devido às alterações observadas previamente nas células cartilagosas,

Huddleston *et al* (2000) avaliaram o uso da ciprofloxacina em dosagem terapêutica na consolidação óssea de fraturas experimentais em ratos e concluíram que houve retardo na consolidação. ⁽³¹⁾

Perry *et al* (2003), num estudo similar, referem que o retardo da consolidação óssea é um efeito da classe das quinolonas, o que também foi relatado pelo estudo histológico de Tuncay *et al* (2005). ^(37,41) Entretanto, Stahlmann (2002) relata que o efeito condrotóxico da ciprofloxacina não pode ser generalizado como um efeito de classe, pois não foi observado em todas as quinolonas. ⁽²⁸⁾

3.5 PADRONIZAÇÃO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS

As fraturas variam conforme a sua localização, ao mecanismo de trauma e às lesões associadas dos tecidos moles. Para o desenvolvimento de um estudo experimental, tais características devem ser controladas para evitar a criação de muitas variáveis que podem dificultar a interpretação dos resultados. ^(32,33,34)

Bonnarens e Einhorn (1984) desenvolveram um aparelho simples e barato no qual uma guilhotina romba produziu fraturas fechadas transversas de fêmur de ratos fixados com fios metálicos intramedular com mínima cominuição e mínima angulação do fio. Concluíram que houve padronização das fraturas. ⁽³²⁾

Vialle *et al* (2004) desenvolveram um aparelho similar para produção de fraturas de fêmures de ratos fixadas com fios metálicos (Kirschner) intramedular. Obtiveram fraturas transversas e oblíquas curtas em 25 ratos Wistar e concluíram que o aparelho foi simples de usar e produziu fraturas padronizadas quanto ao tipo, à localização e ao mecanismo de trauma. ⁽³³⁾

Probst *et al* (1999) referiram que a produção padronizada de fraturas experimentais fechadas evita a manipulação cirúrgica da fratura, impedindo a perda do hematoma fraturário e favorece a consolidação. ⁽⁴²⁾

Grundnes e Reikeras (1992), num estudo onde produziram fraturas bilaterais fechadas de fêmur de ratos e realizaram fixação com haste intramedular fechada de um lado e aberta do outro, concluíram que as fraturas com fixação fechada consolidaram melhor com 4 semanas, mas a resistência com 12 semanas foi

igual. ⁽⁴³⁾

3.5.1 Fixação de fraturas experimentais

A fixação das fraturas experimentais pode ou não ser realizada, dependendo do objetivo do estudo.

Castro *et al* (2005) relataram que a fixação das fraturas experimentais em ratos por meios invasivos pode evoluir com complicações como infecção, cominuição da fratura e óbito. Além disso, salientaram que a imobilização com gesso pode evoluir com síndrome compartimental. Por isso, recomendaram que as fraturas experimentais em ratos não devem ser estabilizadas. ⁽⁹⁾

Entretanto, outros estudos referiram que a fixação fechada da fratura é segura e não altera a consolidação, pois a introdução fechada da haste intramedular evita a perda do hematoma fraturário, não lesa as partes moles ao redor, acarreta em mínima lesão endosteal e propicia marcha com apoio precoce. ^(33,34,42,43,44)

Além disso, outros estudos afirmaram que ensaios biomecânicos em fraturas fixadas podem ser realizados após a retirada da haste intramedular, pois não há alteração na consolidação óssea. ^(34,45)

3.6 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM RATOS

O osso do rato consiste de osso primário com uma estrutura lamelar não-Haversiana, diferenciando-o do osso humano neste sentido. Entretanto, a base fisiológica da remodelação é semelhante à do humano, o que o indica para a realização de estudos experimentais. ⁽⁴⁶⁾

Udupa e Prasad (1963) estudaram a consolidação óssea em fraturas de ratos e a dividiram em 4 fases: fibroblástica, produção de colágeno, osteogênica e remodelação. A fase fibroblástica ocorre na primeira semana após a fratura e se caracteriza pela proliferação de fibroblastos provenientes do periósteo com posterior proliferação de condroblastos e osteoblastos. Na segunda semana,

inicia a fase de produção de colágeno, onde há diminuição da proliferação celular e ocorre produção de fibras colágenas no espaço entre os fragmentos. A fase osteogênica abrange a terceira e quarta semanas e se caracteriza pela proliferação e hipertrofia de condroblastos, os quais são substituídos por osteoblastos que produzem nova substância intercelular e osso novo. A fase de remodelação corresponde a quinta e sexta semanas, quando o excesso de massa óssea é reabsorvido. ⁽⁴⁷⁾

Na análise da presença de células cartilaginosas após fraturas experimentais em ratos, Giordano *et al* (1999) referem que a denominação mais adequada para a segunda fase seria de fibrocartilaginosa pois se observou predomínio de condroblastos em relação aos fibroblastos neste período. ⁽⁶⁾

Einhorn (1998) observou síntese importante de cartilagem hialina aproximadamente 9 dias após a produção de fraturas em ratos e Castro *et al* (2005) encontraram organização do hematoma, tecido fibrocartilaginoso e focos de cartilagem hialina na segunda semana após fratura diafisária de tíbia em ratos. ^(9,48)

Quanto à avaliação do processo final da consolidação, alguns autores encontraram consolidação óssea após um período de 6 semanas em fêmur de ratos submetidos à osteotomia. ^(6,44)

3.6.1 Estudos biomecânicos em ratos

Vários estudos têm utilizado os ensaios mecânicos na avaliação da consolidação óssea em ratos por considerarem uma excelente forma de análise do calo ósseo. ^(8,45,50)

Engesaeter, Ekeland e Langeland (1978) descreveram um aparelho para medir as propriedades mecânicas das forças de flexão e torção de fêmur de ratos tanto em ossos intactos quanto em fraturados. Concluíram que o aparelho pode ser usado para investigação dos efeitos de drogas e hormônios no processo de consolidação óssea em fêmur de ratos. ⁽⁴⁵⁾

Pedroni (2005), num estudo realizado na linha de pesquisa de trauma do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da PUCPR, analisou diferentes

diâmetros (0,5 e 1 mm) de fios de aço (Kirschner) utilizados como hastes intramedulares na fixação de fraturas de fêmures de ratos. Após um período de 6 semanas, fez a eutanásia e utilizou uma máquina universal de ensaios da marca EMIC® para os ensaios de flexão de três pontos e não teve dificuldades de realizá-los. Concluiu que a resistência do calo ósseo foi maior nas fraturas fixadas com hastes de maior diâmetro. ⁽³⁴⁾

Utvag, Rindal e Reikeras (1999) realizaram estudo biomecânico e usaram o teste de três pontos na avaliação de força e mineralização de fêmur de ratos. Referiram que a carga máxima de falha do osso foi interpretada como a força do osso e medida em Newtons. ⁽⁴⁹⁾

Probst *et al* (1999) utilizaram o ensaio de três pontos num estudo biomecânico sobre a fixação de fraturas de tibia de ratos com diferentes tipos de hastes e concluíram que hastes mais resistentes têm calo ósseo mais rígido. ⁽⁴²⁾

Pessan, Volpon e Shimano (1996) utilizaram o ensaio mecânico de flexão no estudo da resistência do fêmur de ratas nas faces côncava e convexa e concluíram que não houve diferença entre as faces. ⁽⁵⁰⁾

Molster e Gjerdet (1984) estudaram os efeitos da instabilidade na consolidação de fraturas de fêmur de ratos por meio de ensaio de flexão de três pontos e concluíram que a instabilidade rotacional cria micromovimentos que podem aumentar a força de flexão, mas não aumentam a consolidação óssea. ⁽⁵¹⁾

Curcelli *et al* (2005) usaram uma máquina universal de ensaios tipo eletromecânica da marca EMIC® para a realização do ensaio de três pontos num estudo biomecânico do efeito da enoxaparina na consolidação de fratura de tibia de ratos e não constataram diferenças na consolidação. ⁽¹²⁾

Muller *et al* (2004), num estudo para avaliação do diclofenaco sódico na consolidação de fraturas de tibia de ratos, usaram a mesma máquina e concluíram que o diclofenaco sódico diminuiu a resistência do calo ósseo. ⁽⁸⁾

3.7 ENSAIO MECÂNICO DE TRÊS PONTOS

Na biomecânica, os estudos da força de flexão atuantes sobre a diáfise dos ossos longos e ou sobre o calo ósseo formado podem ser realizados mediante o ensaio mecânico de três pontos. ⁽⁵²⁾

O ensaio mecânico de três pontos é um tipo de ensaio de flexão e consiste em três forças atuantes sobre o osso. São produzidos dois momentos periféricos iguais e um terceiro em sentido contrário. Cada momento é um produto de cada uma das forças atuantes na periferia e nas perpendiculares ao eixo de rotação, e eqüidistantes ao ponto de apoio da terceira força, que atua no sentido contrário (Figura 1). ⁽⁵²⁾

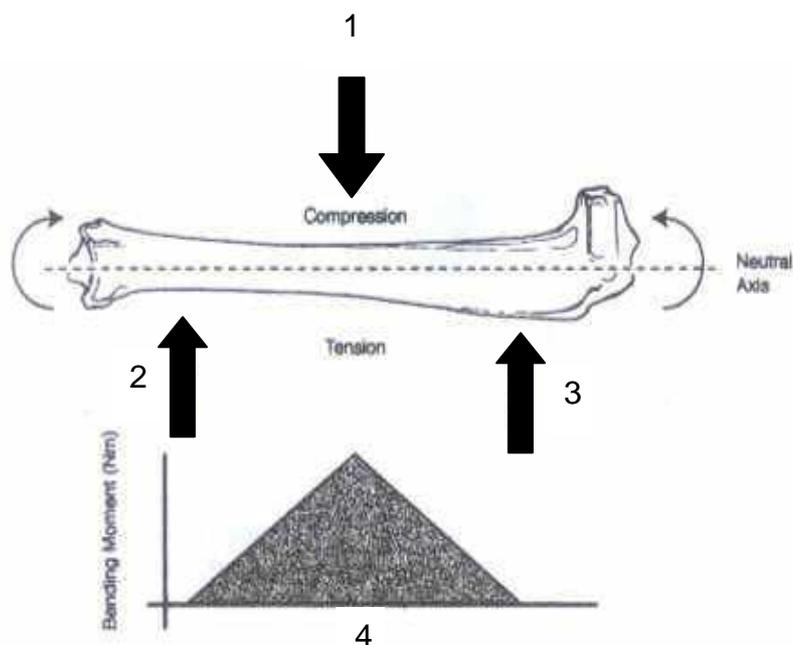


Figura 1 – Representação do ensaio mecânico de três pontos. 1 - Força de flexão; 2 e 3 - Apoios (momentos) laterais; 4 - Representação gráfica das forças
 Fonte: Yuehuei e Draughn, Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. Boca Raton. CRC Press LLC 2000. p. 210. ⁽⁵²⁾

Souza (1982) referiu que a determinação das propriedades mecânicas de um material é realizada por vários ensaios. Geralmente, estes ensaios são destrutivos, pois promovem a ruptura ou a inutilização do material. Dentre esses

ensaios, estão classificados os de tração, dobramento, flexão, torção, fadiga, impacto e compressão. ⁽⁵³⁾

Também, relatou que os ensaios de dobramento e de flexão fornecem uma indicação do grau de deformação plástica que foi suportado pelo material quando da fratura. De um modo geral, estes ensaios consistem em dobrar um corpo de prova de eixo retilíneo, tubular, retangular ou quadrado, assentado em dois apoios afastados a uma distância especificada, de acordo com o tamanho do corpo de prova. Por intermédio de um cutelo, uma força contrária às duas forças perpendiculares e que possui um diâmetro D é aplicada por um esforço de flexão no centro do corpo até que seja atingido um ângulo de dobramento especificado (ângulo α). O cutelo tem um diâmetro que varia conforme a severidade do ensaio, sendo também indicado nas especificações, geralmente em função do diâmetro ou da espessura do corpo de prova (Figura 2). ⁽⁵³⁾

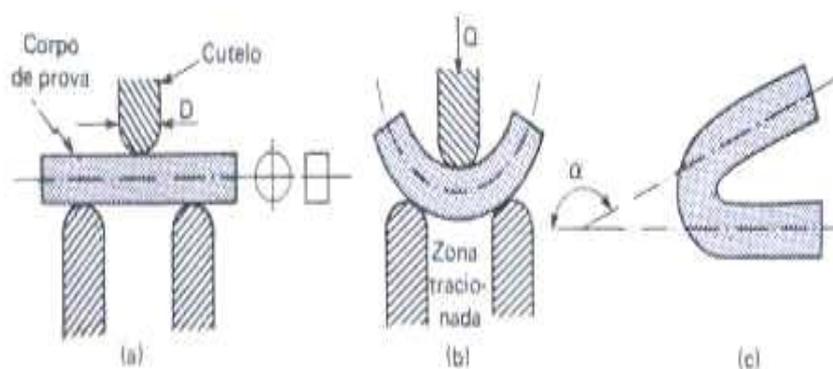


Figura 2 – Representação do ensaio de flexão de três pontos e de dobramento. (a) e (b) - Esquema de ensaio de dobramento; (c) - Corpo de prova dobrado até um ângulo α .
 Fonte: Souza AS. Ensaios mecânicos de materiais metálicos. Fundamentos teóricos e práticos. 5ª ed. São Paulo: Edgard Blücher; 1982. p. 138 ⁽⁵³⁾

Os cálculos possíveis com o teste de três pontos são: área do momento de inércia, força necessária para fratura (força de flexão) e módulo de elasticidade.

O propósito do teste de flexão de três pontos é estabelecer a força relativa do osso quando forças são aplicadas como flexão deformante sobre um eixo. Para a maioria dos casos, o osso contra-lateral serve como controle. O osso quebra primeiro em tensão e a fratura propaga para o lado da compressão abrindo uma asa de borboleta. ⁽⁵²⁾

4. MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o registro nº 197 (APÊNDICE) e seguiu as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Lei 6638/1979 sobre Pesquisa em Animais.

O estudo seguiu as normas de Vancouver ⁽⁵⁴⁾ e a normalização de trabalhos técnico-científicos do Sistema de Bibliotecas da PUCPR ⁽⁵⁵⁾ conforme orienta o parágrafo segundo do artigo 34 da seção IV do capítulo III do Regimento Geral do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da PUCPR.

4.1 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

4.1.1 Caracterização da amostra

Foram estudados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, com idade entre 100 a 120 dias e com peso entre 250 e 350 g. Todos os animais foram oriundos do Biotério Central da PUCPR.

4.1.2 Ambiente de experimentação

Os ratos foram alojados em grupos de 2 animais em gaiolas de polipropileno, de dimensões padronizadas para espécie, no Biotério Central da PUCPR. O ciclo de luz foi controlado (ciclo claro-escuro de 12 horas) à temperatura ambiente de 20°C (± 2). Os animais receberam água e ração (Nuvilab CR-1®, Nuvital, Colombo-PR, Brasil) à vontade.

4.2 ETAPAS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Anestesia

A anestesia foi realizada na região glútea por injeção intramuscular de cloridrato de cetamina na dose de 20 mg/kg e cloridrato de xilazina na dose de 50 mg/kg.

4.2.2 Procedimento cirúrgico: fixação intramedular do fêmur

O procedimento foi realizado em bancada cirúrgica localizada no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória da PUCPR.

A técnica consistiu em realizar, na pata esquerda, tricotomia e antissepsia com solução de iodo a 1% (Figura 3). Após, realizou-se incisão mediana ao nível da articulação do fêmur com a tíbia esquerda para exposição das fibras do quadríceps.

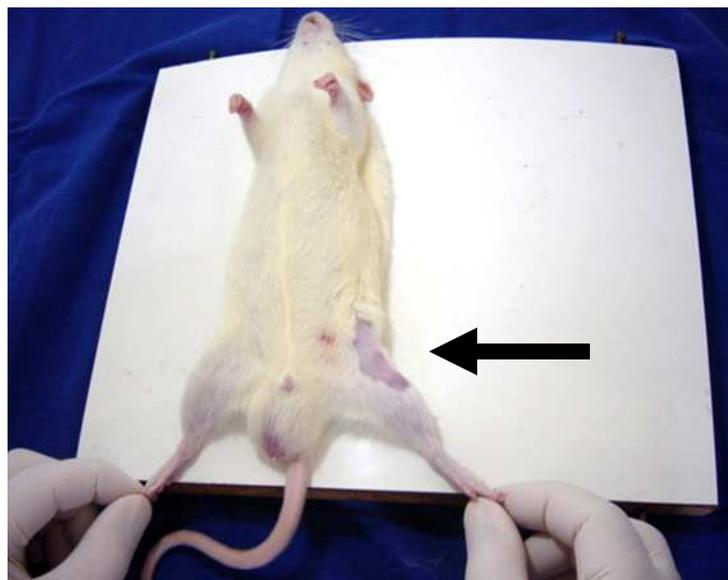


Figura 3 – Tricotomia (seta) realizada na área para o acesso cirúrgico no joelho esquerdo do rato

Através de dissecação longitudinal das fibras do quadríceps e de luxação lateral da patela, os côndilos femorais ficaram expostos para confecção de um ponto de entrada com uma agulha 40 x 1,2 mm no centro do intercôndilo. Neste ponto, introduziu-se no canal medular do fêmur um fio de aço (Kirschner) estéril de 1 mm de diâmetro com auxílio de um perfurador à bateria da marca Bosch® e que passou pela diáfise e grande trocanter retrogradamente até exteriorizá-lo na pele adjacente ao fêmur proximal (Figuras 4 e 5).



Figura 4 – Orifício inicial com agulha no centro do intercôndilo do fêmur do rato



Figura 5 – Passagem do fio de aço no canal intramedular do fêmur do rato com auxílio do perfurador à bateria

Então, o fio foi tracionado proximalmente para dentro da diáfise femoral, retirando-o da articulação do joelho do animal. Depois, a sua ponta proximal foi cortada e dobrada para evitar migração para dentro da articulação (Figura 6). A extremidade proximal do fio foi sepultada abaixo da pele do animal e o fechamento da incisão foi realizado com fio Mononylon® 3-0.

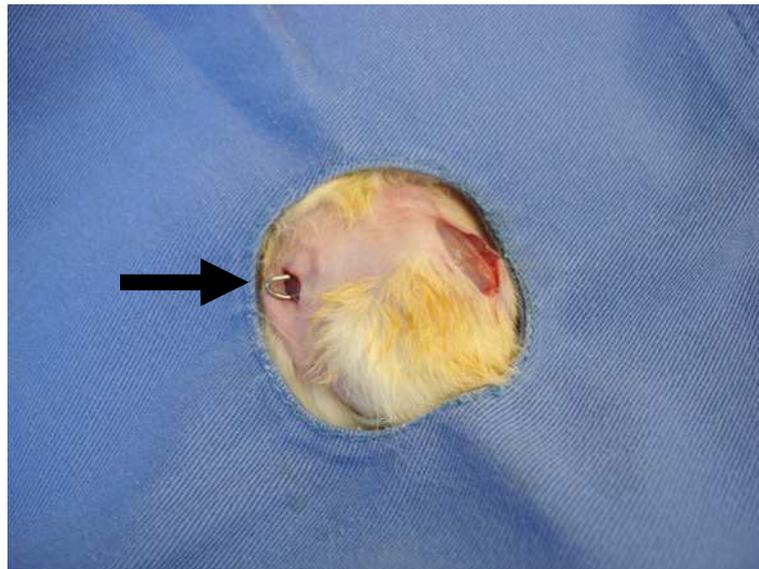


Figura 6 – Exteriorização e dobramento do fio de aço (seta) adjacente ao fêmur proximal do rato

4.2.3 Fraturas padronizadas de fêmur

Os ratos, ainda anestesiados, foram submetidos à fratura da diáfise do fêmur esquerdo em seu terço médio por aparelho que mimetiza guilhotina romba e produz fraturas padronizadas, seguindo-se a metodologia dos estudos de Vialle *et al* (2004), Pedroni (2005) e Mussi Filho *et al* (2006) (Figuras 10 e 11). ^(13,33,34)

O aparelho utilizado é formado por um corpo, um suporte para o animal, um sistema para liberar a guilhotina e um peso de aço de 500 g. O corpo do aparelho consiste de uma base e duas plataformas de madeira montadas sobre barras verticais. As duas plataformas têm uma fenda por onde desce a barra de aço que, por sua vez, é liberada de uma altura de 30 cm, mediante a liberação de

uma trava. Sua queda é parada por outra trava que limita a queda a 1 mm além do ponto de contato da barra com o fêmur do animal, restringindo, portanto, a deformação angular tanto do osso como da haste intramedular. O animal é posicionado em decúbito dorsal, com o membro inferior em abdução e com a região a ser fraturada posicionada entre dois suportes metálicos. A guilhotina cai no centro desse suporte, causando a fratura nesta região (Figuras 7, 8 e 9).⁽³³⁾

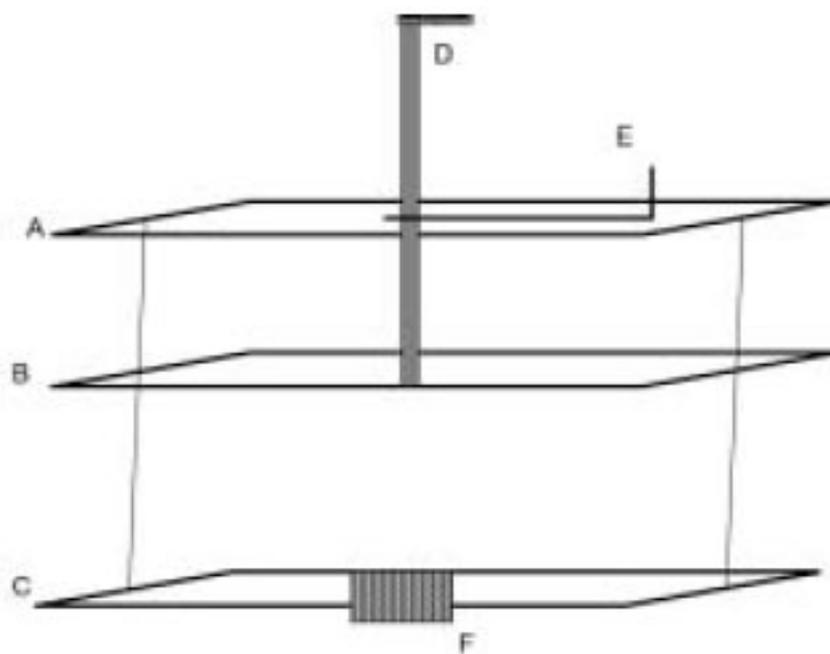


Figura 7 – Desenho esquemático do aparelho utilizado para confecção de fraturas padronizadas em fêmur de ratos. A, B e C: plataformas de madeira, D: barra de aço, E: trava da barra de aço, F: suporte para o animal

Fonte: Vialle *et al.* Rev Bras Ortop 2004; 39(6):325.⁽³³⁾



Figura 8 – Aparelho utilizado para confecção das fraturas padronizadas no fêmur dos ratos

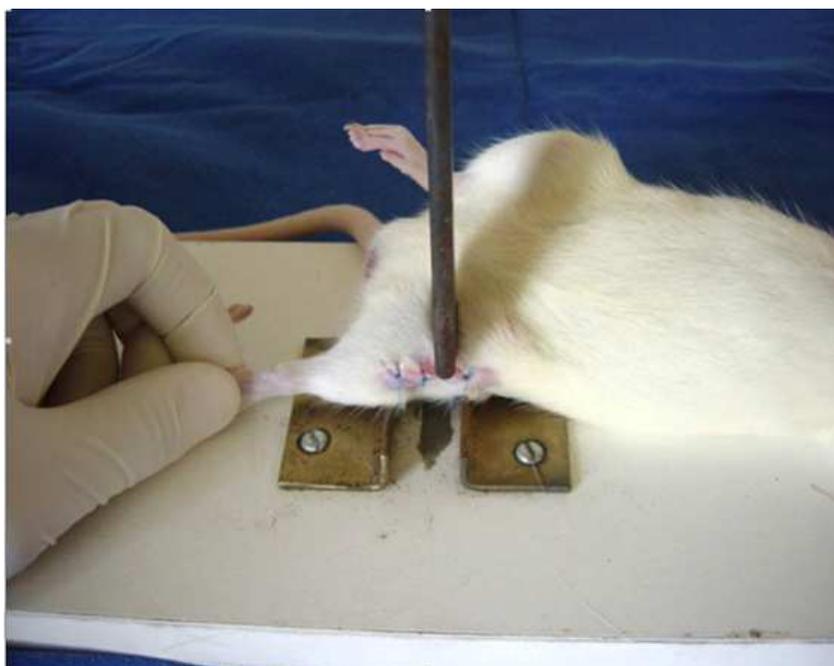


Figura 9 – Posicionamento do rato no aparelho no momento da execução da fratura na diáfise do fêmur

4.2.4 Radiografia pós-operatória

O local e a configuração das fraturas bem como o posicionamento dos fios de aço intramedulares no pós-operatório imediato foram controlados por intermédio de exames radiográficos (Figura 10) realizados por profissional com experiência em exames com animais. Os exames demonstraram um padrão de fraturas transversas ou oblíquas curtas na diáfise do fêmur esquerdo em todos os animais. Utilizou-se aparelho portátil de radiografia da marca Procion® (modelo Ion X 10) que não permite fugas de radiação, com intensidade do tubo de 10 mA, foco 0,8 x 0,8 mm e distância de 20 cm do foco à pele. Os exames foram repetidos após 6 semanas do procedimento para avaliação da consolidação óssea.

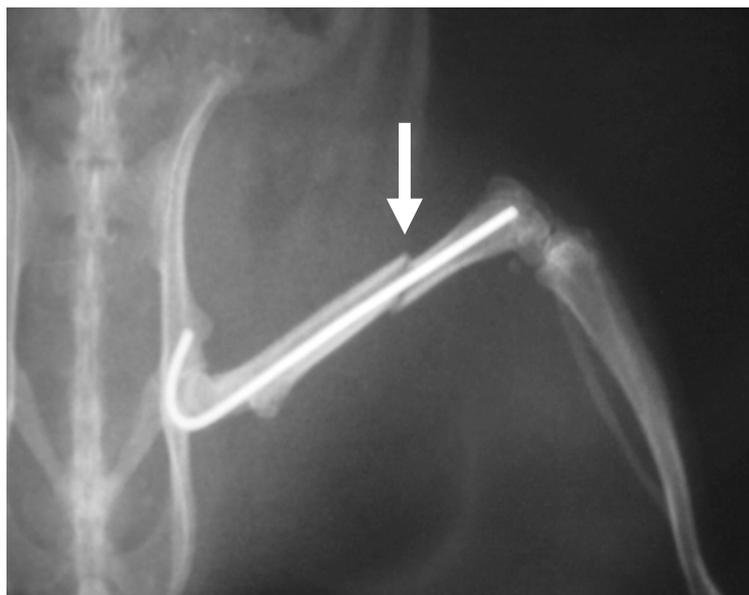


Figura 10 – Radiografia pós-operatória imediata confirmando a fratura na diáfise do fêmur (seta) e o posicionamento intramedular do fio de aço

4.2.5 Pós-operatório

A dor no pós-operatório foi controlada com analgésico e antitérmico flunixinina meglumina (Banamine®, Schering-Plough) administrado por via intramuscular na

região glútea na dose única de 1,1 mg/kg.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os ratos foram divididos em 2 grupos de 10 animais. Os procedimentos no grupo estudo (Cipro) foram realizados numa primeira etapa e os no grupo Controle, numa segunda etapa. No grupo Cipro, após 12 horas do procedimento e realizada durante 6 semanas, fez-se a administração de ciprofloxacina (HalexIstar®) por via subcutânea na dose de 50 mg/kg peso, duas vezes ao dia com intervalo de 12/12 horas. No grupo Controle, fez-se a injeção de 2 ml de soro fisiológico a 0,9% por via subcutânea durante o mesmo período e no mesmo intervalo do grupo Cipro.

4.4 EUTANÁSIA

Após o período de 6 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia seguindo a Resolução 714/2002, utilizando-se dose letal de cloridrato de cetamina (148 mg/kg) por via intraperitoneal.

4.5 PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS

As patas fraturadas (lado esquerdo) e as não fraturadas (lado direito) de cada animal foram desarticuladas, as partes moles foram retiradas e os fios de aço dos fêmures operados foram retirados com auxílio do perfurador à bateria (Figura 11). Os fêmures foram radiografados da forma já referida e imersos em solução de formalina para fixação.

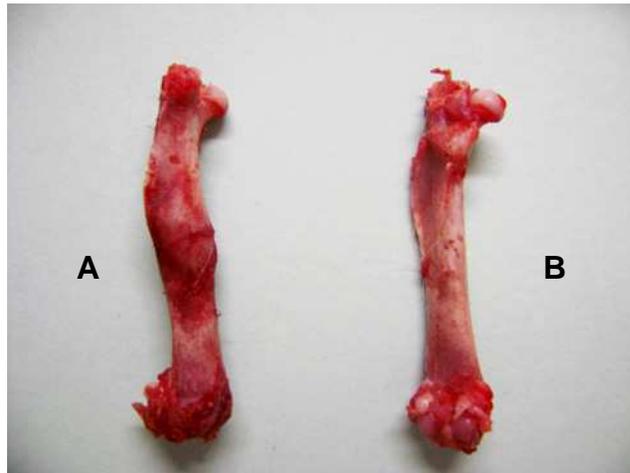


Figura 11 – Peças anatômicas do fêmur fraturado (A) e do fêmur não fraturado (B) após a desarticulação do animal

Depois de desarticulados, os animais foram devidamente embalados em sacos de lixo próprios e levados ao depósito de lixo hospitalar do biotério para posterior captação pelo serviço de lixo hospitalar da cidade de Curitiba.

4.6 ENSAIOS BIOMECÂNICOS

Após uma semana, os fêmures preparados foram levados ao Laboratório de Mecânica da PUCPR para a realização do estudo biomecânico. As peças foram retiradas da solução de formalina e deixadas à temperatura ambiente por uma hora. Então, os testes foram realizados utilizando-se uma máquina universal de ensaios destrutivos da marca EMIC® (modelo DL-500, São José dos Pinhais-PR, Brasil), conectada a um computador com *software* de ensaio mecânico e programa de automação Tesc (versão *standard*, servidor *VirMaq* e linguagem de programação *TestScript*) (Figura 12).



Figura 12 – Máquina universal de ensaios destrutivos conectada ao computador

Os ossos foram submetidos a forças de flexão de três pontos com força máxima, com o cutelo de 5 mm atuando na diáfise e no calo ósseo e as forças foram medidas e registradas em Newtons (N). Usou-se a célula de carga SV100 com valor de correção = 11,05769. Foram testados os fêmures fraturados (calo ósseo) e os sem fratura (fêmur normal) em ambos os grupos (Figura 13).



Figura 13 – Ensaio mecânico de três pontos no calo ósseo do fêmur do rato. Notar os apoios laterais para suporte do osso e o cutelo atuando no calo ósseo do fêmur

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi feito estatisticamente aferido para um nível de significância de 5%, poder do teste de 90% e diferença mínima relevante a ser detectada igual a 15N da resistência observada no grupo controle. O número de animais calculado foi de 16 ratos.

Inicialmente, os grupos Cipro e Controle foram analisados em relação à força no calo ósseo e no fêmur normal. Após, comparou-se o calo ósseo com o fêmur normal dentro de cada grupo.

Os resultados do estudo foram expressos por médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximos.

Para a comparação dos grupos em relação à força, foi usado o teste t de Student para amostras independentes. Para comparação do calo ósseo com o fêmur normal dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A avaliação da condição de normalidade da variável foi feita usando-se o teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

5. RESULTADOS

Apesar do cálculo da amostra considerar 16 ratos para o estudo, os procedimentos foram realizados em 20 animais, pois eventuais intercorrências poderiam acontecer. Dezesesseis animais evoluíram com ganho ponderal, marcha normal e as avaliações macroscópicas e radiográficas dos ossos demonstraram fraturas sem sinais de infecção. Estes ratos entraram no estudo. Um rato de cada grupo apresentou osteomielite, um rato do grupo controle foi a óbito na primeira semana pós-operatória e um rato do grupo Cipro foi a óbito no dia da eutanásia. Estes animais foram excluídos da pesquisa.

As avaliações macroscópicas e radiográficas dos fêmures fraturados dos ratos, após 6 semanas dos procedimentos cirúrgicos, demonstraram consolidação óssea em todos os animais avaliados (Figuras 14 e 15).

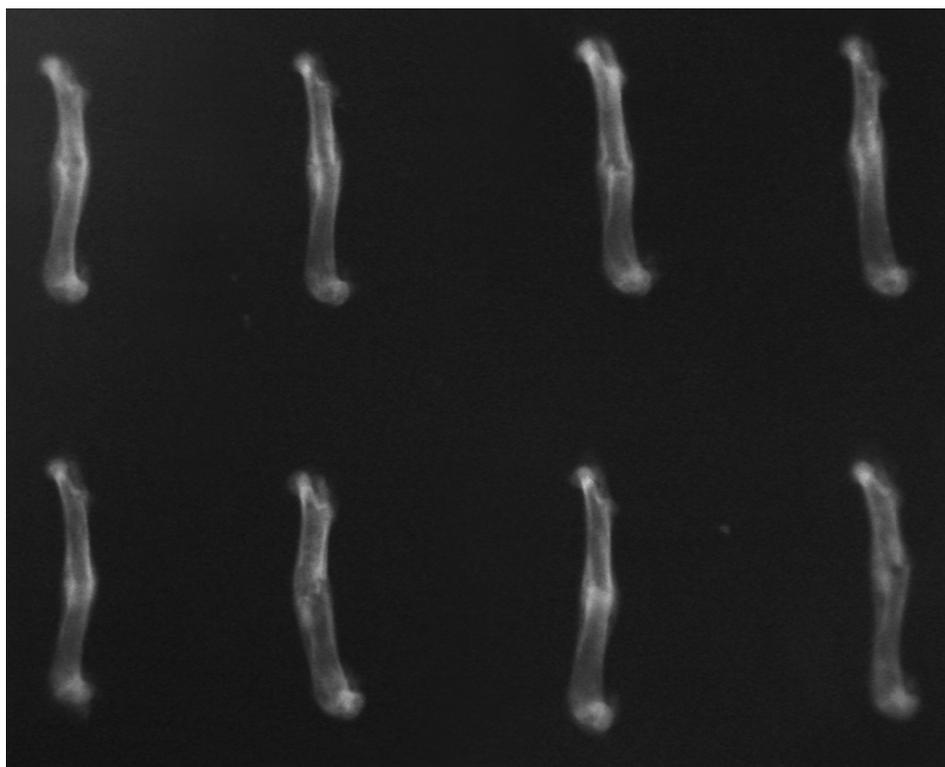


Figura 14 – Radiografia final dos fêmures fraturados do grupo Controle. Notar a consolidação da fratura em todos os ossos

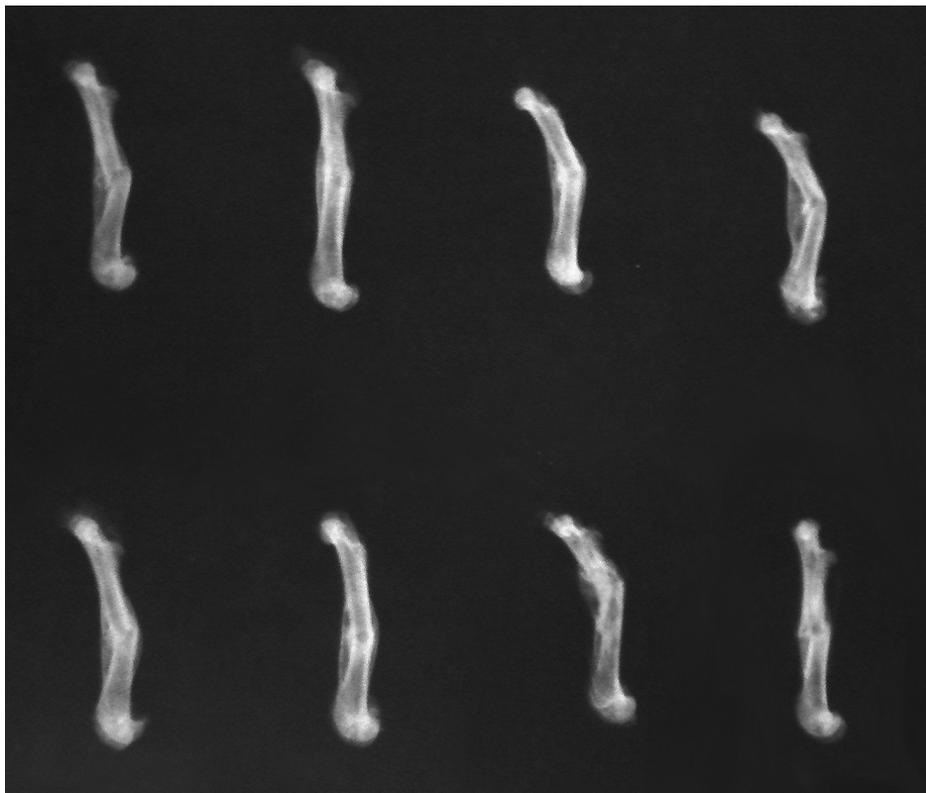


Figura 15 – Radiografia final dos fêmures fraturados do grupo Cipro. Notar a consolidação da fratura em todos os ossos.

Os resultados dos estudos biomecânicos obtidos em cada grupo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da resistência do calo ósseo e do fêmur normal nos ensaios biomecânicos nos grupos Cipro e Controle após 6 semanas da fratura.

Grupo	Rato	Calo ósseo*	Fêmur normal*
Cipro	1	61,17	97,87
	2	91,76	103,99
	3	61,17	128,46
	4	42,82	91,76
	5	79,52	122,34
	6	79,52	91,76
	7	91,76	110,11
	8	61,17	116,22
Controle	9	65,39	79,40
	10	68,69	83,37
	11	63,25	76,16
	12	76,71	93,47
	13	82,09	115,31
	14	77,50	99,52
	15	76,71	92,98
	16	87,9	106,93

*Valores expressos em Newtons.

Inicialmente, para o calo ósseo e o para fêmur normal, testou-se a hipótese nula de que a média de força é igual para os dois grupos, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Em seguida, para cada grupo, testou-se a hipótese nula de que a média para o calo ósseo é igual à média para o fêmur normal contra a hipótese alternativa de médias diferentes. Os resultados são apresentados na Tabela 2 e no Gráfico1.

Tabela 2 – Resultados das médias, medianas, valores mínimos e máximos e desvios padrões da resistência do calo ósseo nos ensaios biomecânicos nos grupos Cipro e Controle após 6 semanas da fratura.

Variável	Grupo	n	Média*	Mediana*	Mínimo*	Máximo*	Desvio* padrão
Calo ósseo	Controle	8	74,78	76,71	63,25	87,90	8,44
	Cipro	8	71,11	70,35	42,82	91,76	17,28
Fêmur normal	Controle	8	93,39	93,23	76,16	115,31	13,60
	Cipro	8	107,81	107,05	91,76	128,46	13,85

*Valores expressos em Newtons.

Na comparação da resistência do calo ósseo entre os grupos Controle e Cipro, não foi encontrada diferença significativa ($p=0,601$).

Na comparação da resistência do fêmur normal entre os grupos Controle e Cipro, não foi encontrada diferença significativa ($p=0,054$).

Na comparação da resistência do calo ósseo com o fêmur normal no grupo Controle, foi encontrada diferença significativa ($p<0,001$).

Na comparação da resistência do calo ósseo com o fêmur normal no grupo Cipro, foi encontrada diferença significativa ($p=0,002$).

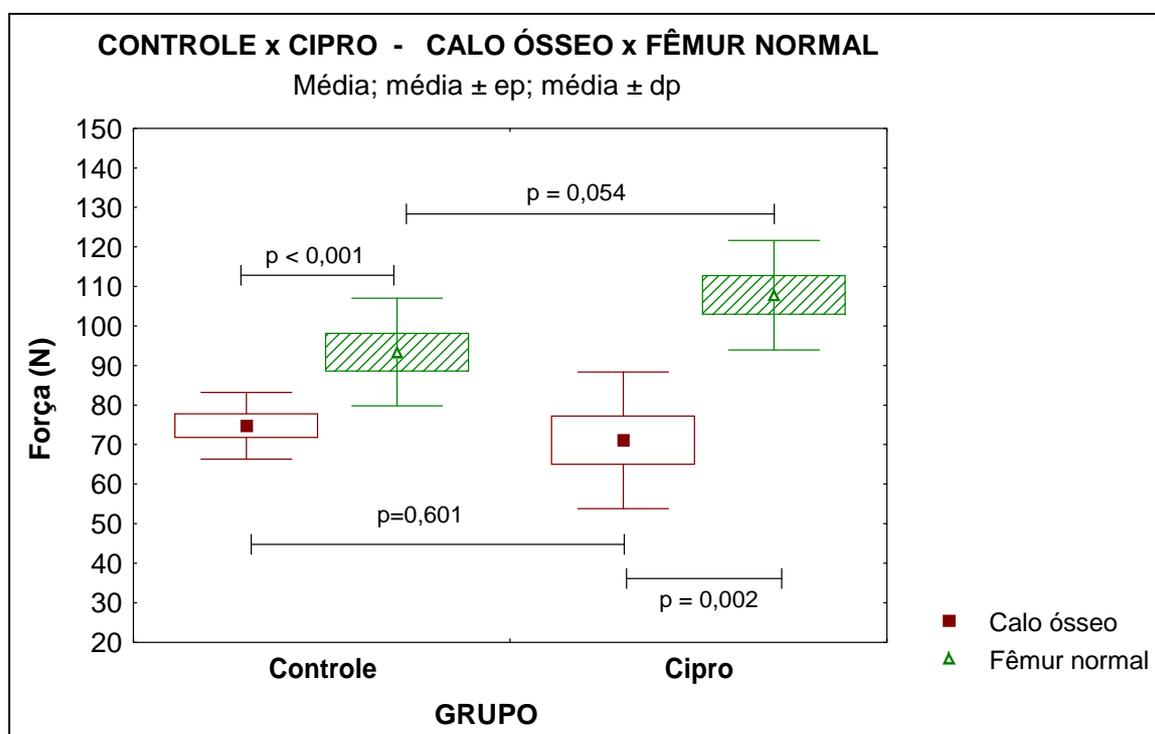


Gráfico 1 – Comparativo entre as médias e os desvios padrões da resistência do calo ósseo e do fêmur normal nos grupos Cipro e Controle.

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o trauma tem sido a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes abaixo dos 40 anos de idade. O impacto sócio-econômico desta situação é expressivo, visto que estes pacientes estão em fase altamente laborativa e produtiva. ^(1,2)

Os traumatismos variam quanto à intensidade e à energia, sendo que muitos são de alta energia e causados por acidentes automobilísticos e atropelamentos. Nestes casos, são freqüentes os politraumatismos que necessitam de atendimento emergencial em centros especializados onde os pacientes são tratados segundo o protocolo de atendimento inicial do *Advanced Trauma Life Support (ATLS)*. ^(1,2,5)

Nos traumas de alta energia, o fêmur é um dos ossos mais afetados e as fraturas comumente ocorrem na região diafisária. ^(1,2,4,5) Estas fraturas podem ser simples ou complexas, fechadas ou expostas e associadas a lesões de partes moles. Nos pacientes politraumatizados, ocorrem outras fraturas concomitantes e lesões em outros locais, como o tórax, o abdômen, o crânio e a pelve. Por isso, a abordagem precoce destes pacientes é fundamental para salvar a vida e minimizar a morbidade. Além disso, o tratamento destes pacientes geralmente é prolongado e muitas vezes são necessários internamentos em unidade de tratamento intensivo e vários procedimentos cirúrgicos. ^(1,2)

As fraturas diafisárias do fêmur no adulto necessitam de tratamento cirúrgico por meio da osteossíntese que propicia a estabilidade necessária à consolidação óssea. A fixação é realizada com implantes metálicos que podem ser internos ou externos conforme o tipo da fratura e as lesões associadas. ^(2,3,4,5)

Nas fraturas isoladas, a haste intramedular é o método de escolha de tratamento por permitir a fixação sem a necessidade de expor a fratura, com conseqüente menor lesão de partes moles, e o carregamento compressivo cíclico, o que estimula a consolidação. ^(2,3,4,5)

Nas fraturas expostas, o fixador externo serve como alternativa de fixação por facilitar o tratamento das lesões de partes moles, podendo ser substituído por haste intramedular após a cicatrização das partes moles e caso a fratura não evolua com infecção. ^(3,5)

Nos politraumatismos, as placas com parafusos e os fixadores externos podem ser usados nas fraturas devido à colocação mais rápida, o que é muito importante nestes pacientes para salvar a vida e evitar complicações sistêmicas. (2,5)

Entretanto, os pacientes com fraturas do fêmur podem evoluir com complicações locais e sistêmicas. Nos pacientes politraumatizados, devido ao longo período de internamento e ao fato de ficarem restritos no leito por muito tempo, pneumonias por aspiração e infecções do trato gênito-urinário e do sistema gastrointestinal são freqüentes e o tratamento com antibioticoterapia específica deve ser realizado. (2,3,4,5)

Além disso, nas fraturas expostas do fêmur, há a contaminação do próprio trauma além da extensa lesão das partes moles e do osso propriamente dito, propiciando um meio para desenvolvimento de infecções. Nestas situações, o tratamento deve ser feito com limpeza e desbridamento cirúrgicos e também com antibióticos específicos. (2,3)

Dentre os antibióticos indicados nas infecções associadas às fraturas do fêmur, a ciprofloxacina é um dos mais usados, sendo a quinolona mais utilizada atualmente. Ela possui boa absorção oral e parenteral, excelente penetração tecidual e fácil posologia, o que favorece seu uso. Entretanto, apresenta efeitos adversos como a condrotoxicidade. (23,24,25,26,27,28,29) Como no processo de consolidação óssea há presença de células cartilaginosas, surgiu o interesse em estudar a influência deste antibiótico na consolidação.

Nas bases de dados pesquisadas (Lilacs, Scielo, Proquest, Ovid, Pubmed e Medline), apenas 2 relatos foram encontrados para avaliar a influência da ciprofloxacina na consolidação óssea. No primeiro estudo experimental em ratos, os autores realizaram análise histológica, radiológica, biomecânica e ultra-estrutural e concluíram que houve retardo na consolidação óssea com o uso de concentrações terapêuticas da ciprofloxacina. (31) Porém, as fraturas foram realizadas em ambos os fêmures e não foi relatado se foram ou não fixadas. Como a avaliação de um osso não fraturado é importante, pois serve de controle em cada animal, este é um fato a ser criticado neste estudo. Além disso, o grupo controle não recebeu nenhuma administração de substância e a administração do antibiótico ocorreu somente uma semana após a fratura, o que pode alterar os resultados, visto que na segunda semana já há a presença de células

cartilagenosas. ^(9,11,48) Também, os ratos sofreram eutanásia com 4 semanas e o teste biomecânico foi realizado por meio da análise de força e rigidez com falha em torção, o que também diferenciou da presente pesquisa. Segundo Engesaeter, Ekeland e Langeland (1978), angulações nas fraturas consolidadas podem alterar os resultados de testes biomecânicos em torção. ⁽⁴⁵⁾ Como as fraturas não foram fixadas, a ocorrência de desvios e angulações é maior, o que também pode alterar os resultados. E não foi relatada a avaliação macroscópica dos ossos após a desarticulação dos animais.

No segundo estudo, os autores também realizaram trabalho experimental em ratos e avaliaram histologicamente a consolidação óssea após administração de 4 tipos de quinolonas (ofloxacina, norfloxacina, pefloxacina e ciprofloxacina). Concluíram que todas retardaram a formação do calo ósseo em ratos. Como no primeiro estudo, as fraturas foram realizadas em ambos os lados, a administração das quinolonas só foi realizada após 7 dias da fratura e por 3 semanas e a eutanásia foi feita com 4 semanas. ⁽³⁷⁾

Outras drogas são usadas concomitantemente ao tratamento das fraturas e neste grupo se enquadram analgésicos, antiinflamatórios, anticoagulantes e antibióticos. Como muitas destas são usadas por períodos prolongados e efeitos adversos podem ocorrer, várias pesquisas têm sido realizadas para avaliar uma possível influência na consolidação. Os antiinflamatórios são os que mais comumente têm alterado este processo, pois modificam a fase inflamatória e retardam a consolidação. ^(7,8,11,35) Clinicamente, a interação entre as diversas drogas poderia alterar ainda mais este processo.

No presente trabalho, após a aprovação do projeto pelo CEUA-PUCPR, os animais foram obtidos e alojados no biotério. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sem dificuldades, pois seguiram a mesma técnica operatória de outros estudos na mesma linha de pesquisa. ^(13,33,34) A fixação dos fêmures foi feita sem dificuldades com fios de aço (Kirschner) de fácil aquisição no mercado. Fez-se a fixação dos ossos antes da realização das fraturas por ser mais fácil o controle da passagem intramedular do fio. Estes fios funcionam como hastes intramedulares, causando pouco ou nenhum dano à circulação endosteal e permitindo carga cíclica à fratura, o que estimula a consolidação. Apesar de alguns estudos na literatura não realizarem fixação das fraturas experimentais ^(7,9,11,12), optou-se pela

fixação com estes fios para simular o tratamento que é realizado em humanos na maioria das vezes.

As hastes intramedulares utilizadas em humanos podem ser maciças ou canuladas. As hastes canuladas possuem maior diâmetro, entretanto necessitam de alargamento do canal medular que é feito com fresas especiais, o que acaba lesando a circulação endosteal do fêmur. Já as hastes maciças possuem menor diâmetro, mas têm a vantagem de não lesar os vasos endosteais do fêmur por não necessitar de fresagem do canal medular. Por isso, optou-se pela utilização de fios metálicos rígidos que atuam como hastes maciças no canal medular do fêmur do rato para evitar a lesão da circulação endosteal.

Em relação à confecção de fraturas padronizadas em animais, a maioria dos estudos experimentais utiliza carga manual na produção de fraturas, sem um controle preciso das forças aplicadas. Por isso, é fundamental a utilização de métodos em que a confecção da fratura siga um mesmo padrão. O aparelho utilizado para confecção das fraturas padronizadas foi simples de usar e o controle radiográfico realizado imediatamente após a fratura confirmou o padrão e o local das fraturas na diáfise do fêmur dos ratos. Os estudos prévios na mesma linha de pesquisa já tinham demonstrado a facilidade de manuseio e a especificidade deste aparelho. ^(33,34) Pequenos encurvamentos nos fios de aço não conferiram dificuldades na retirada posterior nem alteraram a consolidação das fraturas. E, como já relatado, a retirada do fio de aço antes do teste biomecânico não influencia nos resultados. ^(32,45)

A dor pós-operatória foi controlada com uma droga (Banamine®) com ação mais analgésica e em dose única imediatamente após os procedimentos cirúrgicos em todos os animais, evitando-se uma possível interferência no processo de consolidação. Não há relatos de alterações na consolidação óssea com a droga utilizada.

A administração subcutânea da ciprofloxacina foi realizada em intervalos rigorosos de 12 horas e na dosagem terapêutica de 50 mg/kg de peso como normalmente é utilizada em humanos. Não houve dificuldades nesta administração. O medicamento foi armazenado à temperatura ambiente e protegido da luz e da umidade, conforme orientações do fabricante.

Em relação ao grupo controle, no projeto inicial estava planejado o uso dos dados do estudo de Pedroni (2005) como controle, pois seria utilizado um grupo

com mesmo número de animais e fixação com fio de aço de mesmo diâmetro. ⁽³⁴⁾ Após uma análise mais minuciosa, verificou-se que os ratos estudados haviam permanecido em temperaturas e biotérios diferentes do presente estudo e não se realizou nenhuma administração de substâncias. Para evitar que estas diferenças pudessem criar variáveis que seriam difíceis de interpretar posteriormente, optou-se por estudar um grupo controle seguindo a mesma metodologia do grupo Cipro. A administração de soro fisiológico foi realizada para que houvesse manipulação semelhante dos animais e funcionasse como placebo, evitando-se criar viés.

A opção pelo estudo experimental foi devido à dificuldade de realizar estudos da consolidação óssea em humanos e à importância de se controlar os diversos fatores que podem alterar a consolidação, pois, clinicamente, seria praticamente impossível estudá-los separadamente. Segundo Utvag e Reikeras (1998), o modelo experimental em ratos é uma forma valiosa de avaliação devido à padronização e à reprodutibilidade das fraturas, sendo um animal conveniente e amplamente usado em pesquisas. ⁽⁴⁶⁾ O rato foi escolhido como modelo experimental por ser o animal mais utilizado na avaliação da consolidação óssea, pois apresenta osso e calo ósseo com características biomecânicas muito similares às dos humanos, além da facilidade de manuseio e de cuidados do mesmo. ⁽⁴⁵⁾

Quanto ao prazo de 6 semanas para a eutanásia e para a avaliação do calo ósseo, seguiram-se os estudos que encontraram consolidação óssea em ratos após este período. ^(6,11,44,47) Nas avaliações macroscópicas e radiográficas, após este período, todas as fraturas estavam consolidadas em ambos os grupos.

Ademais, o estudo do fêmur sem fratura é importante para que haja um controle em cada animal, visto que outras doenças podem influenciar na consolidação. Por isso, avaliou-se também o lado não fraturado para afastar uma possível alteração óssea do animal.

Na análise do calo ósseo, existem vários métodos de avaliação e a radiologia é a forma mais compatível de reprodução em humanos, pois é útil tanto para o diagnóstico inicial quanto para a avaliação seriada da consolidação, além de ser um exame simples, rápido e barato. Por isso, optou-se pelo exame radiográfico que foi realizado sem dificuldades.

Quanto à opção pelo ensaio biomecânico na avaliação do calo ósseo, é importante salientar que, segundo a Lei de Wolff ^(5,30), há uma íntima

interdependência entre a morfologia e as solicitações mecânicas do osso, que responde aos esforços mecânicos com modificações da sua arquitetura interna. Além disso, duas das principais funções do aparelho locomotor são a sustentação e a transmissão de forças e a importância de se compreendê-las deve-se às lesões que podem ocorrer (ex: fraturas) e à necessidade de repará-las. Assim, quanto mais se conhecer sobre o aparelho locomotor do ponto de vista mecânico, tanto em doenças e lesões quanto na saúde, melhores serão as condições de tratar as lesões e restaurar as funções. ⁽⁵⁰⁾ Também, o estudo do osso como estrutura intacta é interessante, pois os resultados refletem melhor a capacidade do sistema músculo-esquelético *in vivo*, a sua função como alavanca e a capacidade de resistir aos esforços em várias condições. ⁽⁵⁰⁾ Por isso, a análise biomecânica é uma das melhores formas de avaliação do calo ósseo em ratos. Como o estudo seguiu um método já utilizado na mesma linha de pesquisa, a realização do estudo biomecânico foi padronizada e de fácil execução. ⁽³⁴⁾

Outras formas de análise da consolidação óssea como histologia e imunohistoquímica poderiam ser utilizadas para avaliação da seqüência da consolidação óssea, desde a fratura até a consolidação final. Porém, haveria necessidade de criação de mais grupos e utilização de mais ratos, o que aumentaria os custos do estudo e também poderia aumentar o número de variáveis. Além disso, avaliações histológicas da consolidação com uso da ciprofloxacina já foram realizadas em trabalhos prévios. ^(31,37) Por isso, houve a preferência pelo ensaio biomecânico como forma de avaliação juntamente com o exame radiológico.

Dentre os ensaios mecânicos, o teste de flexão de três pontos foi escolhido devido à confiabilidade do método, pois o mesmo é capaz de mensurar, em Newtons, valores numéricos que permitem comparações e estudos estatísticos com uma especificidade segura. ⁽⁴²⁾

Pode-se argumentar que a ciprofloxacina é usada no tratamento de infecções e, por isso, o modelo experimental também deveria ter algum tipo de infecção para que o estudo fosse mais fidedigno. Optou-se por não fazer um modelo com infecção, pois seria difícil de controlá-la nos animais, aumentaria a possibilidade de óbitos e criaria outras variáveis como retardo de consolidação e pseudoartrose cuja causa seria difícil de interpretar.

Em relação aos resultados encontrados, houve diferença estatística na avaliação da resistência entre o calo ósseo e o fêmur não fraturado em cada animal, mostrando que houve diminuição da resistência do calo ósseo em ambos os grupos. O desvio padrão da resistência do calo ósseo no grupo Controle foi menor (8,44) que no grupo Cipro (17,28) devido ao rato 4 do grupo Cipro. Não foi encontrada explicação para o resultado deste rato. A diferença entre resistência do fêmur normal e do calo ósseo foi menor no grupo Controle. O calo ósseo do grupo da Cipro apresentou menor resistência em relação ao grupo Controle, porém, estatisticamente sem significância. Como a única variável do estudo foi utilização ou não da ciprofloxacina, não se pôde afirmar estatisticamente que esta droga alterou a resistência do calo ósseo.

Diferentemente dos relatos prévios que demonstraram a influência negativa da ciprofloxacina na consolidação óssea em ratos ^(31,37), este estudo experimental não confirmou a hipótese de que a ciprofloxacina altera a resistência do calo ósseo. Em relação àqueles trabalhos, houve algumas diferenças no método. Primeiro, o prazo para início da administração da ciprofloxacina foi desde o primeiro dia neste estudo, pois, como já relatado, na segunda semana já há células cartilaginosas. O fêmur contralateral também foi avaliado, o que permitiu a análise do osso não fraturado como controle no próprio animal, sendo importante para afastar alterações ósseas. Optou-se pela fixação da fratura para evitar grandes desvios, diferentemente daqueles estudos nos quais não se realizou fixação da fratura, o que pode causar desvios maiores, com a conseqüente imprecisão dos resultados. A técnica de fixação intramedular, usada na presente pesquisa, já demonstrou que não altera o processo da consolidação óssea. ^(33,34,42,43,44) O estudo biomecânico foi feito com teste em flexão de três pontos que é mais seguro e confiável que o teste de torção, pois este é muito influenciado por desvios nas fraturas. Também, deve ser salientado que os testes biomecânicos foram realizados após 6 semanas das fraturas, pois nesta fase há a consolidação óssea e uma maior resistência do calo ósseo que em 4 semanas, época em que foram realizados os testes do primeiro estudo.

Apesar dos relatos de alterações histológicas nas células cartilaginosas observadas durante a consolidação óssea com o uso da ciprofloxacina ^(31,37), a análise biomecânica deste estudo mostrou que não houve diferença estatística na

resistência do calo ósseo em relação ao grupo controle após o período de 6 semanas da fratura.

7. CONCLUSÃO

Não houve diferença estatisticamente significativa na resistência do calo ósseo de fraturas padronizadas de fêmures de ratos com o uso da ciprofloxacina em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

1. Singer BR, McLauchlan GJ, Robinson CM, Christie J. Epidemiology of fractures in 15000 adults: the influence of age and gender. *J Bone Joint Surg (Br)* 1998;80-B(2):243-8.
2. Fernandes HJA, Reis FB. Fraturas da diáfise de fêmur. In: Franco SF, Lourenço PRB. *Traumatologia Ortopédica*. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. p. 19-30.
3. Muller ME, Allgöwer M, Schneider R, Willenegger H, eds. *Manual de Osteossíntese*. 3ª ed. São Paulo: Manole; 1993.
4. Campbell WC, eds. *Cirurgia Ortopédica de Campbell*. 8ª ed. São Paulo: Manole; 1996.
5. Rockwood Jr CA, Green DP, Bucholz RW, eds. *Fraturas em adultos*. 3ª ed. São Paulo: Manole; 1993.
6. Giordano V, Giordano M, Knackfuss IG, Caldas C, Apfel MIR, Kissmann G, e cols. Influência do tenoxicam no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 1999;34(6):395-400.
7. Mendes PHB, Scofano Jr AR, Silva MG, Souza I, Silva Filho NM, Abreu AV, e cols. Consolidação da fratura após o uso prolongado de corticóide: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 2001;36(9):345-51.
8. Muller SS, Curcelli EC, Sardenberg T, Zuccon A, Crudis Jr JL, Padovani CR. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. *Acta Ortop Bras* 2004;12(4):197-204.
9. Castro PCF, Hoshino A, Brito RB, Dias Jr LB, Brito JAF, Barros RSM, e cols. Estudo do processo de consolidação óssea em ratos tratados com acetaminofen: avaliações radiográfica e histológica. *Rev Bras Ortop* 2005; 40(10):614-20.

10. Oliveira LAA. Avaliação do efeito do risendronato sódico na consolidação das fraturas: estudo experimental em ratos [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

11. Giordano M, Tamanini A, Giordano Neto V, Apfel MIR, Elias N, Graça R, Knackfuss I. Influência da enoxaparina na consolidação das fraturas: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 1999;34(3):208-13.

12. Curcelli EC, Muller SS, Ueda AK, Padovani CR, Maffei FHA, Hossne WS. Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura de tibia no rato: avaliação clínica e anatomopatológica e biomecânica. *Acta Ortop Bras* 2005;13(1):13-16.

13. Mussi Filho S, Vidigal L, Canova RA, Cruz HA, Zaniolo FJ, Vialle LRG. Estudo experimental dos efeitos da heparina de baixo peso molecular (enoxaparina) na formação de calo ósseo em fêmur de ratos. *Acta Ortop Bras* 2006;14(2):78-82.

14. Hessen MT, Ingerman MJ, Kaufman DH, Weiner P, Santoro J, Korzeniowski OM, et al. Clinical efficacy of ciprofloxacin therapy for gram-negative bacillary osteomyelitis. *Am J Med* 1987;82(4A):262-5.

15. Waldvogel FA. Use of quinolones for the treatment of osteomyelitis and septic arthritis. *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 5:1259-63.

16. Lew DP, Waldvogel FA. Quinolones and osteomyelitis: state-of-the-art. *Drugs* 1995;49 Suppl 2:100-11.

17. Suh B, Lorber B. Quinolones. *Med Clin North Am* 1995;79(4):869-94.

18. Knapp TP, Patzakis MJ, Lee J, Seipel PR, Abdollahi K, Reisch RB. Comparison of intravenous and oral antibiotic therapy in the treatment of fractures caused by low-velocity gunshots. A prospective, randomized study of infection rates. *J Bone Joint Surg (Am)* 1996;78(8):1167-71.

19. Lew DP, Waldvogel FA. Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. *Drugs* 1999;58 Suppl 2:85-91.

20. Patzakis MJ, Bains RS, Lee J, Shepherd L, Singer G, Ressler R, et al. Prospective, randomized, double-blind study comparing single-agent antibiotic

therapy, ciprofloxacin, to combination antibiotic therapy in open fracture wounds. *J Orthop Trauma* 2000;14(8):529-33.

21. Pavoni GL, Falcone M, Baiocchi P, Tarasi A, Cassone M, Serra P, et al. Conservative medical therapy of infections following osteosynthesis: a retrospective analysis of a six-year experience. *J Chemother* 2002;14(4):378-83.

22. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 2002;65(3):455-64.

23. Ingham B, Brentnall DW, Dale EA, MacFadzean JA. Arthropathy induced by antibacterial fused N-alkyl-3-pyridone-carboxylic acids. *Toxicol Lett* 1977;1:21-26.

24. Mont MA, Mathur SK, Frondoza CG, Hungerford DS. The effects of ciprofloxacin on human chondrocytes in cell culture. *Infection* 1996;24(2):151-5.

25. Stahlmann R, Lode H. Toxicity of quinolones. *Drugs* 1999;58 Suppl 2:37-42.

26. Stahlmann R, Kuhner S, Shakibaei M, Schwabe R, Flores J, Evander SA, et al. Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. *Arch Toxicol* 2000;73(10-11):564-72.

27. Multhaupt HA, Alvarez JC, Rafferty PA, Warhol MJ, Lackman RD. Fluoroquinolone's effect on growth of human chondrocytes and chondrosarcomas. In vitro and in vivo correlation. *J Bone Joint Surg (Am)* 2001;83 Suppl 2 (Pt 1):56-61.

28. Stahlmann R. Clinical toxicological aspects of quinolones. *Toxicol Lett* 2002;127(1-3):269-77.

29. Li P, Cheng NN, Chen BY, Wang YM. In vivo and in vitro chondrotoxicity of ciprofloxacin in juvenile rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(10):1262-6.

30. Miller MD, ed. Review of orthopaedics. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Company; 2000.

31. Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture-healing. *J Bone Joint Surg (Am)* 2000;82-A(2):161-73.

32. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984; 2(1):97-101.

33. Vialle E, Vialle LR, Boechat R, Bley JP, Scussiato R, Busato, T, e cols. Produção de fratura padronizada de fêmur em ratos. *Rev Bras Ortop* 2004; 39(6):323-9.

34. Pedroni MA. Avaliação da força de flexão de três pontos sobre o calo ósseo nas fraturas diafisárias de fêmures de ratos fixadas com dois diâmetros de hastes diferentes [dissertação de mestrado]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2005.

35. Altman RDD, Latta LL, Keer R, Renfree K, Homicek FJ, Banovac K. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma* 1995;9(5):392-400.

36. Haleem AA, Rouse MS, Lewallen DG, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Gentamicin and vancomycin do not impair experimental fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 2004 Oct;427:22-4.

37. Tuncay I, Ozbek H, Kosem M, Unal O. A comparison of effects of fluoroquinolones on fracture healing (an experimental study in rats). *Ulus Travma Derg* 2005;11(1):17-22.

38. Menschik M, Neumuller J, Steiner CW, Erlacher L, Koller M, Ullrich R, et al . Effects of ciprofloxacin and ofloxacin on adult human cartilage in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(11):2562-65.

39. Danisovicova A, Brezina M, Belan S, Kayserova H, Kayserova E, Hruskovic K, et al. Magnetic resonance imaging in children receiving quinolones: no evidence of quinolone-induced arthropathy. A multicenter survey. *Chemotherapy* 1994;40:209-214.

40. Pradhan KM, Arora NK, Jena A, Susheela AK, Bhan MK. Safety of ciprofloxacin therapy in children: magnetic resonance images, body fluids level of fluorides and linear growth. *Acta Paediatr* 1995;84:555-560.

41. Perry AC, Prpa B, Rouse MS, Piper KE, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Levofloxacin and trovafloxacin inhibition of experimental fracture-healing. *Clin Orthop* 2003;(414):95-100.

42. Probst A, Jansen H, Ladas A, Spiegel HU. Callus Formation and Fixation Rigidity: A Fracture Model in Rats. *J Orthop Res* 1999;17(2):256-60.

43. Grundnes O; Reikeras O. Closed versus open medullary nailing of femoral fractures: Blood flow and healing studied in rats. *Acta Orthop Scand* 1992;63(5):492-6.

44. Kaartinen E; Paavolainen P; Holmstrom T; Slati P. Loss of bone strength intramedullary nailing. *Acta Orthop Scand* 1985;56:487-90.

45. Engesaerter LB; Ekeland A; Langeland N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. *Acta Orthop Scand* 1978;49:512-8.

46. Utvag SE; Reikeras O. Effects of nail rigidity on fracture healing, strength and mineralisation in rat femoral bone. *Arch Ortop Trauma Surg* 1998;118:7-13.

47. Udupa KN, Prasad GC. Chemical and histochemical studies of organic constituents in fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg* 1963;45:770-9.

48. Einhorn TA. The Cell And Molecular Biology Of Fracture Healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355 Suppl:7-21.

49. Utvag SE; Rindal B; Reikeras O. Effects of Torsional Rigidity on Fracture Healing Strength and Mineralization in Rat Femora. *Journal of Orthop Trauma* 1999;13(3):212-9.

50. Pessan VJO; Volpon JB; Schimano AC. Ensaio mecânico de flexão nas faces côncava e convexa da diáfise do fêmur de ratas. *Rev Bras Ortop* 1996; 31(7):600-4.

51. Molster AO; Gjerdet NR. Effects of instability on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 1984;55:342-6.

52. Yuehuei H; Draughn RA. Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. Boca Raton. CRC Press LLC 2000. p. 3-16, 207-217.

53. Souza AS. Ensaio mecânicos de materiais metálicos. Fundamentos teóricos e práticos. 5ª ed. São Paulo: Edgard Blücher; 1982.

54. Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas. Normas para apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas. In: Miranda JA. Normas de Vancouver. 1998 Fev 14 (69 ecrans). Disponível em: URL: <<http://homepage.esoterica.pt/~nx2fmd/Normas.html>>. Acesso em 17 de Dezembro de 2007.

55. Richardt NF, Zenere C, Lopes A. Normalização de trabalhos técnicos-científicos: trabalhos acadêmicos, monografias de graduação, monografias de pós-graduação, dissertações e teses. Sistema de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba: Biblioteca Central; 2007.

APÊNDICE