

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DE CIRURUGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

JÚLIO CÉSAR CHAGAS E CAVALCANTE

EFEITOS DO IBANDRONATO DE SÓDIO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS
FEMORAIS DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR

FORTALEZA

2011

JÚLIO CÉSAR CHAGAS E CAVALCANTE

EFEITOS DO IBANDRONATO DE SÓDIO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS
FEMORAIS DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Metabolismo e comportamento biocelular no estresse.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

FORTALEZA

2011

JÚLIO CÉSAR CHAGAS E CAVALCANTE

EFEITOS DO IBANDRONATO DE SÓDIO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS
FEMORAIS DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Metabolismo e comportamento biocelular no estresse.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

Aprovada em 14 de Março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (U.F.C.)

Profa. Dra. Sheila Márcia Fontenele
Faculdade de Medicina Christus (U.F.C.)

Ao senhor meu DEUS, fonte de toda inspiração e vida, que sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador Professor Doutor José Alberto Dias Leite, pelo apoio, orientação e, sobretudo pela amizade. Sempre com muita tranquilidade transmitiu confiança nos momentos difíceis e mostrou como se comporta um verdadeiro pesquisador.

À Professora Doutora, Mirna Marques Bezerra Brayner, minha co-orientadora, que sempre soube com otimismo, perseverança e ternura vencer as grandes dificuldades que é realizar pesquisa no agreste do Ceará.

Ao Professor Doutor, Gerardo Cristino Filho, por acreditar em mim e pelo o apoio incondicional a minha pessoa e ao trabalho proposto e por tornar possível a realização dos experimentos na Faculdade de Medicina de Sobral, U.F.C., Campus Derby.

Ao professor Doutor, Vicente de Paulo Teixeira Pinto, grande pesquisador, muito me incentivou e apoiou em todo processo da pesquisa.

Ao professor doutor, José Ronaldo Vasconcelos da Graça, que me ajudou com os experimentos no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Sobral, Campus Derby.

Ao Professor Doutor Edson Holanda Teixeira, coordenador do programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina, UFC, Campus Derby Sobral, colocando-se a disposição para ajudar durante este curso.

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Programa de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela competência e dedicação com que desenvolve suas atividades.

Ao Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru, além de amigo, um grande professor. Com humildade, simplicidade, segurança e paciência me proporcionaram o entendimento da ferramenta desenvolvida e adaptada por ele para nosso estudo. Obrigado por participar da banca de qualificação e pelo melhor estudo estatístico deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante, por participar da banca de qualificação deste trabalho, e desta forma, contribuindo para a melhoria da qualidade desta pesquisa.

Ao Cirurgião Plástico e Mestre Charles Jean Gomes de Mesquita, por aceitar participar da banca examinadora de qualificação e por todas as sugestões valiosas apresentadas.

À Fisioterapeuta e Mestre, Gisele Façanha Diógenes Teixeira, que muito contribui para este trabalho de forma direta e indireta.

Ao médico veterinário, Professor e Mestre, Sidnei Wendell Goiana, um bom amigo e como Coordenador do curso de Medicina Veterinária das Faculdades INTA, por facilitar o nosso acesso às instalações desta Faculdade.

Ao cirurgião dentista e Mestre, Valmirlan Fachine Jamararu, pela inestimável ajuda no estabelecimento da técnica e captura das imagens radiográficas.

À Fisioterapeuta e Mestre, Sânia Nara Costa da Rocha, companheira de mestrado, juntos encontramos problemas e juntos encontramos soluções.

À veterinária Ângela Magalhães Vieira, pelo cuidado que teve com os animais desta pesquisa sempre no rigor da ética.

Ao médico veterinário Robério Ferreira Fiúza, que realizou as radiografias pós - operatórias nos ratos com muita eficiência e profissionalismo.

Ao biólogo, Felipe Silva Maciel, Coordenador dos Laboratórios da Saúde, da Faculdade de Medicina *Christus*, pelo apoio no estudo histológico e execução da digitalização das imagens histológicas.

Ao acadêmico de Medicina Veterinária, Felipe Rocha dos Santos, que me ajudou de forma exemplar a concluir os experimentos, sempre com muita dedicação e respeito aos animais.

À técnica em radiologia, Maria do Socorro Parente Frota, por ter me ajudado tão prontamente na realização dos exames radiológicos com mamógrafo.

Ao técnico de laboratório, Adalberto Nascimento de Lima Júnior, que com atenção e dedicação confeccionou as lâminas histológicas do presente estudo.

Ao técnico de laboratório, Francisco José Gomes, um bom amigo, incansável colaborador nas “difíceis” tarefas do laboratório.

Ao senhor Francisco Ferreira da Silva, “seu Tito”, por todo o carinho e dedicação no projeto e confecção do aparelho de fraturas.

As senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, que tornaram este mestrado menos espinhoso. Muito obrigado senhoras.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Mestrado em Biotecnologia, obrigado pela disponibilidade, dedicação e ensinamentos ministrados.

À Faculdade Christus, pela infra-estrutura cedida, com o microscópio de luz polarizada.

À empresa Nortessíntese, na pessoa do senhor Luis Eufrásio Farias Neto, que nos cedeu gentilmente os fios de *Kirschner* necessários à pesquisa.

À Secretária de Saúde de Sobral, na pessoa da enfermeira, Sandra Maria Melo Sousa, colaborando para a realização das radiografias deste trabalho.

As Faculdades INTA Sobral, por disponibilizar a estrutura do Hospital de Pequenos Animais para a realização das radiografias de controle.

A todos os amigos, que me proporcionaram caminho mais tranqüilo para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos meus pais, Vanildo Honório Cavalcante e Maria Ivonilde Chagas Cavalcante, meus primeiros orientadores que souberam me mostrar os verdadeiros valores: Caridade, Honestidade, Sabedoria.

À minha amada esposa, Iris Flávia Arcanjo e Cavalcante, minha inspiração de retidão e ternura.

Aos meus filhos, Davi Arcanjo e Cavalcante e Pedro Arcanjo e Cavalcante, que tiveram paciência com as minhas ausências.

"E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria".

(Apóstolo Paulo)

RESUMO

EFEITOS DO IBANDRONATO DE SÓDIO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS FEMORAIS DE RATOS TRATADOS COM HASTE INTRAMEDULAR. JÚLIO CÉSAR CHAGAS E CAVALCANTE. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

O Ibandronato de sódio é um medicamento utilizado para o tratamento clínico da osteoporose e por ter ação anticatabólica e causar apoptose no osteoclasto, uma importante célula responsável pela remodelação óssea, foi hipotetizado um efeito na consolidação fraturas na fase de remodelação do calo ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ibandronato de sódio na consolidação das fraturas de fêmures de ratos submetidos á osteossíntese intramedular. Neste estudo foram utilizados 48 ratos machos, adultos, da linhagem *Wistar*, com o peso médio de 336,63g. Todos os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para osteossíntese intramedular do fêmur direito e posteriormente realizado uma fratura padronizada. Eles foram divididos em dois grupos: o grupo Ibandronato, em que foi administrada dose única de 15mg/Kg por gavagem e o grupo controle foi administrado dose única de 1,0ml de solução fisiológica 0,9% também por gavagem, no mesmo dia do procedimento cirúrgico. No 7º, 14º, 28º e 42º dia de pós-operatório seis animais de cada grupo eram eutanasiados e os fêmures foram submetidos a estudo radiográfico para analisar a densidade óptica e área do calo ósseo e estudo histológico, utilizando amostras coradas com *picrosirius red* e analisadas sob a luz polarizada, para quantificar a densidade de colágeno tipo I e tipo III na região cortical próxima a fratura e no calo ósseo. A análise das radiografias mostrou que a área do calo ósseo não apresentava diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle e Ibandronato, mas que na análise intragrupo os dias 28 e 42 o calo era significativamente maior que no dia 7, em ambos os grupos. A densidade óptica na avaliação intergrupos mostrou que o grupo Ibandronato, no 42º dia, apresentava uma maior densidade que o grupo controle. No estudo do colágeno no calo ósseo, a densidade do colágeno tipo I verificada no grupo Ibandronato foi maior que a observada no grupo Controle nos dias 7 e 14, já a densidade de colágeno tipo III verificada no grupo Ibandronato foi menor no dia 7 que no grupo Controle. No estudo do colágeno da cortical próxima ao foco de fratura, o colágeno tipo I no grupo Ibandronato foi significativamente maior no dia 7 que o grupo controle e o colágeno tipo III no grupo Ibandronato foi menor que o grupo Controle. Os resultados encontrados são consistentes o suficiente para afirmar que este fármaco exerce efeito na consolidação de fraturas ósseas aumentando a densidade do colágeno tipo I nas fases iniciais da consolidação.

Palavras-chave: Bifosfonatos. Fratura femoral. Consolidação da fratura. Fixação Intramedular de Fraturas. Ratos *Wistar*. Calo ósseo. Colágeno.

ABSTRACT

EFFECTS OF IBANDRONATE ON FEMORAL FRACTURES HEALING IN RATS TREATED WITH INTRAMEDULLARY SISTEM. JÚLIO CÉSAR CHAGAS E CAVALCANTE. Dissertation (Mastership). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Advisor: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

The Ibandronate sodium is a drug used for clinical treatment of osteoporosis and for anti-catabolic action and cause osteoclast apoptosis, an important cell responsible for bone remodeling, it was hypothesized an effect on fractures in the consolidation phase of callus remodeling. The aim of this study was to evaluate the effect of ibandronate sodium in the fracture of femurs of rats subjected to intramedullary fixation. This study used 48 adult male rats, Wistar, with the average weight of 336.63 g. All animals underwent surgery for intramedullary osteosynthesis of the right femur and subsequently performed a standardized fracture. They were divided into two groups: the ibandronate, which was administered a single dose of 15mg/kg by gavage and the control group was administered a single dose of 1.0 ml of 0.9% saline by gavage also on the same day of the procedure surgery. At 7, 14, 28 and 42 days postoperatively six animals from each group were euthanized and the femurs were subjected to X-ray study to analyze the optical density and area of callus and histological study, using samples stained with picosirius red and analyzed under polarized light, to quantify the density of collagen type I and type III in the cortical region near the fracture and callus. The radiographs showed that the area of the callus showed no statistically significant differences between groups control and ibandronate, but in the intragroup analysis 28 and 42, the callus was significantly higher on day 7 in both groups. The optical density of intergroup evaluation showed that ibandronate group at day 42, showed a higher density than the control group. In the study of collagen in the callus, the density of type I collagen seen in the ibandronate group was higher than that observed in the control group on days 7 and 14, since the density of type III collagen found in the ibandronate group was lower than in the 7 days Control group. In the study of collagen in the cortex, collagen type I in the ibandronate group was significantly greater on day 7 than the control group and type III collagen in the ibandronate group was lower than the Control group. The results are consistent enough to say that this drug has an effect on bone fracture healing by increasing the density of type I collagen in the early stages of consolidation.

Keywords: Diphosphonates, Femoral fractures, Fracture Healing, Fracture Fixation, Intramedullary. Rats, Wistar. Collagen. Bony callus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Estrutura básica do bifosfonatos. Adaptado de Russell,2006.....	20
FIGURA 2-	Delineamento do estudo que avaliou o efeito do ibandronato de sódio na consolidação de fraturas de fêmur em ratos submetidos a osteossíntese intramedular.....	26
FIGURA 3-	Incisão centrada no joelho e dissecação subtendinosa do tendão patelar....	28
FIGURA 4-	Visualização da região intercondiliana do fêmur direito e a incisura intercondilar.....	28
FIGURA 5-	Confecção de um túnel no canal medular do fêmur direito com <i>intracath</i>	29
FIGURA 6-	Introdução de fio de <i>Kirshner</i> no fêmur direito por via retrógada.....	30
FIGURA 7-	Extremidade proximal do fio <i>Kirshner</i> angulada para evitar migração.....	30
FIGURA 8-	Tração do fio de <i>Kirshner</i> na extremidade distal.....	31
FIGURA 9-	Aparelho de fraturas.....	32
FIGURA 10-	Posicionamento adequado do fêmur direito no canaleta transverso do aparelho de fraturas.....	33
FIGURA 11-	Estudo radiográfico.....	35
FIGURA 12-	Análise das imagens radiográficas com o SAMM.....	36
FIGURA 13-	Estudo histológico.....	38
FIGURA 14-	Análise das imagens histológicas com o SAMM.....	40
FIGURA 15-	Área do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea.....	42
FIGURA 16-	Imagens radiográficas digitalizadas no microscópio cirúrgico das peças número 1 nos tempos estudados dos grupos Controle e Ibandronato.....	43
FIGURA 17-	Densidade óptica do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea.....	45
FIGURA 18-	Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea.....	47

FIGURA 19-	Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na cortical próxima ao foco de fratura, nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea.....	49
FIGURA 20-	Imagens histológicas digitalizadas no microscópio sob luz polarizada dos calos ósseos das peças número 1, nos tempos estudados dos grupos Controle e Ibandronato.....	50
FIGURA 21-	Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea.....	52
FIGURA 22-	Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na cortical próxima ao foco de fratura nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Valores da média e desvio padrão da área do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).....	40
TABELA 2-	Valores da média e desvio padrão da densidade óptica do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).....	42
TABELA 3-	Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na região do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).....	43
TABELA 4-	Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na cortical próxima ao foco de fratura, referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).....	45
TABELA 5-	Valores da mediana e intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75) da densidade de colágeno tipo III na região do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).....	47
TABELA 6-	Valores da mediana e intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75) da densidade de colágeno tipo III na cortical próxima ao foco de fratura referentes às aferições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS	22
3. MÉTODO	23
3.1 Aspectos éticos.....	23
3.2 Caracterização da amostra.....	23
3.3 Ambiente de experimentação.....	23
3.4 Delineamento do estudo.....	24
3.5 Procedimento cirúrgico	25
3.6 Indução da fratura.....	29
3.7 Tratamento.....	31
3.8 Estudos radiográficos.....	31
3.9 Estudos histológicos.....	35
3.10 Análises estatísticas.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1 Estudos radiográficos.....	39
4.1.1 Área do calo ósseo.....	39
4.1.2 Densidade óptica do calo ósseo.....	42
4.2 Estudos histológicos.....	43
4.2.1 Densidade do colágeno tipo I no calo ósseo.....	43
4.2.2 Densidade do colágeno tipo I na cortical.....	44
4.2.3 Densidade de colágeno tipo III no calo ósseo.....	47
4.2.4 Densidade de colágeno tipo III na cortical.....	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE	65
ANEXO	71

1. INTRODUÇÃO

O Fêmur é o maior e mais forte osso do corpo humano e em uma pessoa jovem a energia necessária para fraturá-lo é alta. As fraturas diafisárias do fêmur são decorrentes de traumas de alta energia tais como atropelamentos, acidentes automobilísticos, projéteis de arma de fogo, quedas de grandes alturas (HEBERT *et al*, 2009; REIS, 2000; SBOT, 2004). Geralmente acomete homens entre 25 a 35 anos (COHEN; MATTAR JUNIOR; JESUS-GARCIA FILHO, 2007). O diagnóstico clínico é simples, pois os pacientes queixam-se de dores, edema, deformidade, encurtamento e incapacidade funcional no membro acometido. Fraturas podem estar associadas, principalmente, as do anel pélvico, patela e tibia. Lesões vasculares e nervosas periféricas também podem ocorrer (HEBERT *et al*, 2009). O diagnóstico radiológico é necessário e são utilizadas duas incidências radiográficas da coxa para melhor avaliação. Também são realizadas radiografias das articulações adjacentes (quadril e joelho), pois 10 a 15 % das fraturas diafisárias de fêmur estão associadas com fraturas do quadril e joelho ipsilateral que só são diagnosticadas tardiamente (SBOT, 2004; RÜEDI; MURPHY, 2002). As radiografias permitem classificar a fratura diafisária do fêmur de acordo com a morfologia e número de fragmentos. Existem vários sistemas de classificações, porém o mais utilizado é o AO. Este sistema de classificação das fraturas permite através de um sistema alfa numérico estabelecer em ordem crescente a complexidade e prognóstico da fratura (HEBERT *et al*, 2009). Estabelecido o diagnóstico clínico e radiológico é possível propor um tratamento adequado. Devido à extrema morbidade e mortalidade associadas com o tratamento conservador (não cirúrgico), o tratamento cirúrgico constitui hoje o pilar para a abordagem terapêutica das fraturas diafisárias de fêmur (STANNARD; SCHMIDT; KREGOR; 2010). Existem diversos dispositivos de fixação utilizados nos procedimentos cirúrgicos para o tratamento das fraturas com o fim de guiar e apoiar o processo de consolidação óssea (cura óssea) (RÜEDI; MURPHY, 2002). Para a fixação cirúrgica das fraturas do fêmur pode-se utilizar dos fixadores externos, placas de compressão, placa ponte, placa ponte percutânea, hastes intramedulares. A fixação padrão para o tratamento cirúrgico das fraturas diafisárias do fêmur é a haste intramedular (HEBERT *et al*, 2009; STANNARD; SCHMIDT; KREGOR; 2010). Desde 1939 este dispositivo de fixação óssea para tratar fraturas de fêmur vem sendo utilizado (MALTA; REIS; MORALES; SOUZA, 2002) e o princípio de fixação se baseia na de um tubo íntegro (a haste intramedular)

dentro de um tubo quebrado (o fêmur fraturado) (REIS, 2000). Existem controvérsias para à fixação com haste intramedular que incluem a direção de inserção (anterógrada ou retrógrada), como ela é implantada no interior do canal medular (fresada ou não fresada), se é fixada no osso ou não e qual tipo de bloqueio mas é o método mais usado (HEBERT et al, 2009; REIS, 2000; STANNARD; SCHMIDT; KREGOR; 2010). Apesar dos bons resultados obtidos com este tipo de fixação (98 a 99 % de consolidação e menos de 1% de infecção) (STANNARD; SCHMIDT; KREGOR; 2010), complicações existem e podem comprometer o resultado final em qualquer tratamento cirúrgico das fraturas, que é a sua consolidação.

A consolidação das fraturas é um evento fisiológico complexo que envolve a participação coordenada de diversos tipos celulares, que de modo integrado promovem a cura do osso fraturado. Didaticamente é dividido em quatro etapas que se sobrepõem. A etapa inflamatória esta associada ao início da resposta ao trauma em que a lesão vascular local e a perda da arquitetura óssea desencadeiam respostas inflamatórias, semelhantes aquelas que ocorrem em tecidos não ósseos. Macrófagos, plaquetas, granulócitos, linfócitos e monócitos infiltram-se no hematoma fraturário, melhorando a coagulação no trombo fibrinoso, combatendo a infecção, secretando citocinas e fatores de crescimento, que promovem recrutamento adicional de células inflamatórias em um *feedback* positivo para proporcionar a migração e invasão de células tronco mesenquimais multipotentes. A segunda etapa há a formação de calo mole (fibrocartilagem) e histologicamente há um predomínio de condrócitos e fibroblastos. Ocorre a síntese de matriz cartilaginosa com posterior calcificação da matriz e apoptose dos condrócitos. Nos locais onde não há produção de cartilagem, os fibroblastos produzem tecido fibroso, formando áreas fibrocartilaginosas. Neste estágio ocorre o fenômeno da angiogênese e os vasos sanguíneos invadem o calo ósseo mole. A terceira etapa é também conhecida como formação de osso primário onde há uma grande osteogênese. Os osteoblastos têm grande atividade e formam matriz óssea mineralizada. Em condições de grande estabilidade mecânica há formação de calo duro sem modelo cartilaginoso. Uma adequada tensão de oxigênio é necessária para diferenciação dos osteoblastos e por isso a vascularização é fator crítico para formação do calo duro. A quarta etapa da consolidação óssea é a remodelação, que consiste em converter o osso novo exuberante e recém formado, em osso lamelar. A célula predominante nesta etapa é o osteoclasto, que é móvel, multinucleado, ramificado, especializado na reabsorção óssea. Ele adere à superfície óssea criando um meio ácido nesta região de contato que promove a degradação da matriz óssea e os componentes orgânicos como o colágeno. A reabsorção óssea realizada pelo osteoclasto

cria lacunas que posteriormente os osteoblastos são capazes de fixar osso novo (EINHORN, 2005; SCHINDELER *et al*, 2008).

A biologia óssea responde ao trauma com a formação de osso, resposta anabólica, e reabsorvendo osso, resposta catabólica. A fase anabólica domina e precede a fase catabólica. Em condições normais, estas fases promovem de forma coordenada e equilibrada a formação de um calo ósseo robusto mecanicamente funcional, permitindo a restauração da anatomia e função mecânica do osso fraturado. Na consolidação das fraturas, o recrutamento de diversos tipos celulares associados a fatores de crescimento e citocinas, promove respostas não específicas do tecido ósseo ao trauma e são referidas como respostas anabólicas e catabólicas não específicas. O tamanho e a localização da lesão, forças biomecânicas, infecções, doenças, fixação cirúrgica da fratura, uso de medicamentos, aspectos nutricionais, condições genéticas, são alguns dos fatores que têm efeitos nos eventos da consolidação óssea influenciando o anabolismo e o catabolismo específico e inespecífico. Anabolismo deficiente, catabolismo excessivo ou disfunção combinada de anabolismo e catabolismo podem conduzir a uma falha na consolidação óssea. O ideal no modelo de consolidação de fraturas, é uma resposta anabólica robusta com um controle da resposta catabólica até a união óssea (LITTLE *et al*, 2007; SCHINDELER *et al*, 2008).

No modelo dos quatro estágios que descreve a consolidação das fraturas, a remodelação é um processo fundamental no reparo. Ela ocorre no calo mole e é um processo amplamente independente de osteoclasto e é de catabolismo não específico. Já a remodelação do calo duro, é um processo dependente de osteoclasto e de catabolismo específico (SCHINDELER *et al*, 2008). O uso de bifosfonatos, por induzir a apoptose dos osteoclastos, pode interferir no processo de consolidação óssea de fraturas (BAUSS; DEMPSTER, 2007; GUARNIERO *et al*, 2007; HOANG-KIM *et al*, 2009; LITTLE; RAMACHANDRAN; SCHINDELER, 2007; MORRIS; EINHORN, 2005; POUTOS *et al*, 2008). Esta importante classe de medicamento é clinicamente utilizada para tratar doenças caracterizadas pela reabsorção óssea aumentada mediada por osteoclastos. Os bifosfonatos são sintéticos análogos do pirofosfato inorgânico que é de ocorrência natural, que foi modificado para melhorar a estabilidade metabólica e potencial de ligação ao mineral ósseo. As ligações químicas fosfato-oxigênio-fosfato (P-O-P) do pirofosfato inorgânico são substituídas pelas ligações fosfato-carbono-fosfato (P-C-P) não hidrolisável e esta estrutura tridimensional é capaz de se ligar a íons divalentes tais como o cálcio (MORRIS; EINHORN, 2005). Os bifosfonatos possuem grupos químicos diferentes, que são chamados de radicais, localizados

nas posições R¹ e R² de sua estrutura, que confere diferentes afinidades pelo mineral ósseo e diferentes ações anti-reabsortivas respectivamente (Figura 1). O mecanismo de ação destes medicamentos depende da estrutura química, ou seja, da presença ou não de nitrogênio na posição R², dividindo em classes farmacológicas os bifosfonatos que são nitrogenados e aqueles que não são nitrogenados (RUSSELL, 2006).

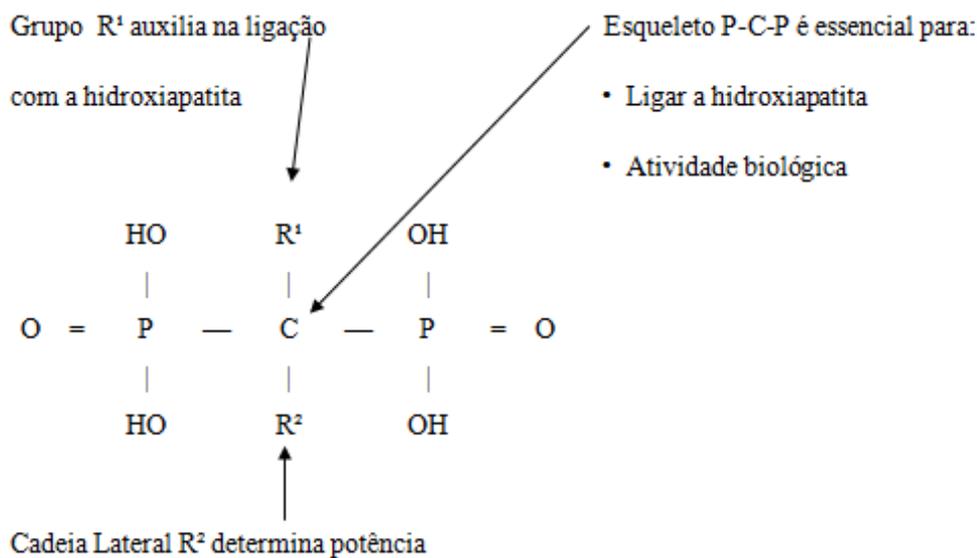


FIGURA 1 – Estrutura básica, do bifosfonatos. Adaptado de Russell, 2006.

Os compostos que não são nitrogenados são metabolizados em análogos não hidrolisáveis da adenosina trifosfato (ATP) e quando internalizado no osteoclasto durante o processo de reabsorção óssea, quer seja normal ou patológica, estes análogos do ATP são citotóxicos e promovem a apoptose do osteoclasto. Já os bifosfonatos nitrogenados quando internalizados nos osteoclastos atuam na via do mevalonato, inibindo a prenilação de proteínas e a consequente formação de GTPase. Esta é uma importante proteína sinalizadora e com a sua falta processos regulatórios dos osteoclastos também são perdidos, tais como controle da morfologia da célula, perda da sinalização da integrina, tráfico de proteína alterado na membrana, perda da membrana pregueada, ruptura do citoesqueleto, e por fim ocorre a apoptose (MORRIS; EINHORN, 2005; RUSSELL, 2006). Bifosfonatos não nitrogenados são considerados de primeira geração e aqueles que são nitrogenados, pois possuem nitrogênio na posição R², podem ser de segunda ou terceira geração. A presença do grupo amino ou nitrogênio no bifosfonato potencializa sua ação anti-absortiva de 10 a 10000

vezes quando comparado com um bifosfonato não nitrogenado (MORRIS; EINHORN, 2005; DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008).

O ibandronato de sódio é um bifosfonato nitrogenado potente, de terceira geração (DOOLEY; BALFOUR, 1999), utilizado para o tratamento da osteoporose. Como todo bifosfonato o ibandronato de sódio tem uma estrutura química central estável de fosfato-carbono- fosfato com radical na posição R¹ tipo OH que confere maior afinidade relativa pelo mineral ósseo (hidroxiapatita) quando comparado com os bifosfonatos com radicais na posição R¹ tipo H ou Cl. Tem também radical na posição R² nitrogenado tipo C₂CH₂N(CH₃)(C₃H₁₁) que confere maior potência da ação anti-absortiva *in vivo* dentre os bifosfonatos orais disponíveis (RUSSELL,2006).

Por via oral o Ibandronato de sódio é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal (TGI), predominantemente na sua porção superior e as concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 1 hora. A fração total do ácido ibandrônico absorvido pelo TGI é baixa, somente aproximadamente 0,6% da dose administrada. Alimentos e bebidas (exceto água pura) podem reduzir sua absorção no TGI, isto porque o Ibandronato de sódio pode se ligar a partículas carregadas formando grandes complexos que são de difícil absorção. É rapidamente distribuído pelo corpo e depurado do sangue. Em três a oito horas após sua administração apenas 10% da concentração plasmática máxima é encontrada. Da dose circulante de Ibandronato de sódio, 40 a 50 % se concentram no osso e menos de 2% é encontrada em tecidos moles. Não sofre biotransformação hepática e é excretado inalterado na urina. Não apresenta potencial para interação com outros medicamentos ou dificulta a excreção de drogas. A meia-vida terminal do ibandronato de sódio no plasma é de 10-60 horas e a meia-vida no osso é de um ano. O *clearance* renal depende da função renal e proporcional ao *clearance* da creatinina (BARRETT *et al.*, 2004). Uma vez absorvido e distribuído no corpo, o ibandronato se liga às superfícies dos ossos e durante o processo de remodelação óssea é internalizado pelo osteoclasto por endocitose. No interior do osteoclasto o Ibandronato de sódio promove a apoptose desta célula pela inibição de enzimas da via do mevalonato (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008).

Os estudos pré-clínicos com animais permitiram documentar a eficácia do Ibandronato de Sódio independente do modelo animal, da via de administração, ou da frequência de administração. Lalla *et al* (1998) demonstraram que a administração contínua de doses orais de Ibandronato de sódio muito além de qualquer dose terapêutica destina-se não só aumentar a massa óssea e densidade mineral óssea, mas também mantém propriedades

mecânicas do osso verificadas em estudos com vértebras de ratos. Bauss, Lalla, Endele e Hothorn (2002) realizaram experimentos em ratas ooforectomizadas utilizando via subcutânea para administração de ibandronato de sódio e concluíram que as concentrações ósseas foram lineares com a dose, sugerindo uma cinética linear no intervalo de doses aplicadas e que em geral, a mesma dose cumulativa total administrada, forneceu resultados equivalentes independente do esquema de administração. Em um modelo de reparo de fratura em cães adultos, Bauss *et al* (2004) constataram que o Ibandronato de sódio não prejudicou a densidade mineral óssea, a estrutura óssea, o reparo e união óssea com administração em longo prazo. Russel (2006) em revisão de artigos pode constatar evidências da eficácia do uso intermitente do Ibandronato de sódio em modelos experimentais de osteoporose com ratos, cães e macacos e que apesar de ajustes para regimes intermitentes de administração, não ocorreu prejuízo para a estrutura, mineralização ou cura óssea. No artigo de revisão de Bauss e Dempster (2007) o Ibandronato de sódio é classificado como um potente bifosfonatos com uma significativa eficácia anti-fratura independente do regime de administração.

Simulando condições patológicas em que ocorre um aumento da absorção óssea, Kurt *et al* (2000) em estudo experimental com células tumorais implantadas no fêmur de ratos, conseguiram avaliar a densidade mineral óssea, o conteúdo mineral ósseo e testes mecânicos, nos animais tratados com Ibandronato de sódio, foi possível preservar a qualidade óssea.

Bauss *et al* (2004) concluíram que o uso de Ibandronato de sódio em dose terapêutica não prejudicou a densidade mineral óssea, estrutura óssea, reparo ósseo, união, parâmetros séricos de formação óssea e de *turnover* após administração subcutânea em cães da raça *Beagle*. Guarniero *et al* (2007) em trabalho experimental com coelhos verificaram, na histomorfometria, maior quantidade de tecidos ósseos nos coelhos em que foi administrado ibandronato de sódio.

Tengvall *et al* (2004), constataram que parafusos de aço inoxidável revestidos com bisfosfonatos (pamidronato dissódico e Ibandronato de sódio) apresentavam testes biomecânicos em que melhorou a fixação mecânica (força de tração e energia de retirada) do parafuso nas tíbias de ratos, Skoglund, Holmertz e Aspenberg (2004) puderam concluir que o Ibandronato de sódio administrado no local do implante ou administrado sistemicamente foi possível melhorar a fixação precoce, Eberhardt *et al* (2007) em um estudo histomorfométrico concluiu que ratos em tratamento contínuo com 5µg/Kg de Ibandronato de sódio intraperitoneal acelera a osteointegração de implantes revestidos de hidroxiapatita.

1.1 Justificativa

Para o tratamento das fraturas, recursos terapêuticos combinados têm sido tentados, o interesse de usar moduladores da resposta biológica ao reparo de fraturas para permitir a união óssea e evitar um retardo ou ausência da consolidação óssea tem sido pesquisado. O ibandronato de sódio, o mais potente fármaco de uso oral utilizado para o tratamento da osteoporose, tem um efeito anti-catabólico, e em modelo experimental, melhora a estrutura óssea, mineralização óssea, cura óssea em fraturas, fixação mecânica e osteointegração de implantes. Não foi encontrado na literatura consultada o uso de ibandronato de sódio como tratamento combinado em fraturas fixadas com haste intramedular. Foi pensado o uso experimental deste bifosfonato como recurso farmacológico para tratamento combinado de fraturas de fêmur fixadas com haste intramedular.

2 OBJETIVO

Verificar os efeitos do Ibandronato de sódio na consolidação de fratura de fêmur em ratos submetido à osteossíntese intramedular.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi realizado obedecendo aos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (U.F.C.), no protocolo número 01/2008 (ANEXO1).

Não há nenhum conflito de interesses na realização do presente estudo, sendo todos os recursos próprios do pesquisador.

3.2 Caracterização da amostra

Foram estudados 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem *Wistar*, machos, adultos, com o peso médio de 336,63g (variando entre 264g e 386g) , provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará *Campus* Derby.

3.3 Ambiente de experimentação

Os animais foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12h, em gaiolas adequadas contendo no máximo 6 animais, recebendo água e ração balanceada irradiada para ratos e camundongos da marca Biotec[®] *ad libitum*. Permaneceram em ambiente climatizado, com a temperatura média de 25° C, no biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Derby.

3.4 Delineamento do estudo

Os 48 animais foram distribuídos em 2 grupos, o grupo Ibandronato e o grupo Controle. Todos os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para osteossíntese com haste intramedular fresada não bloqueada e após o procedimento eram submetidos à fratura no fêmur direito. O grupo Ibandronato composto de 24 animais foi tratado com ibandronato de sódio, via oral 15mg/Kg, por gavagem. O fármaco foi administrado em dose única, no dia do procedimento cirúrgico. O grupo Controle composto de 24 animais foi tratado com solução NaCl 0,9 % , 1ml via oral, também por gavagem, no dia do procedimento cirúrgico.

Seis animais de cada grupo eram eutanasiados com dose letal de cloridrato de cetamina, intraperitoneal, 148 mg / Kg (KUPCZIK *et al*, 2009) no 7°, 14°, 21° e 42° dia de pós-operatório. Após a eutanásia os fêmures dos animais eram ressecados em uma peça anatômica inteira sem partes moles e com preservação do calo ósseo e depois eram submetidos a estudo radiológico e histológico do calo ósseo no respectivo dia da consolidação óssea (UDUPA; PRASAD, 1963). A Figura 2 ilustra o delineamento do estudo.

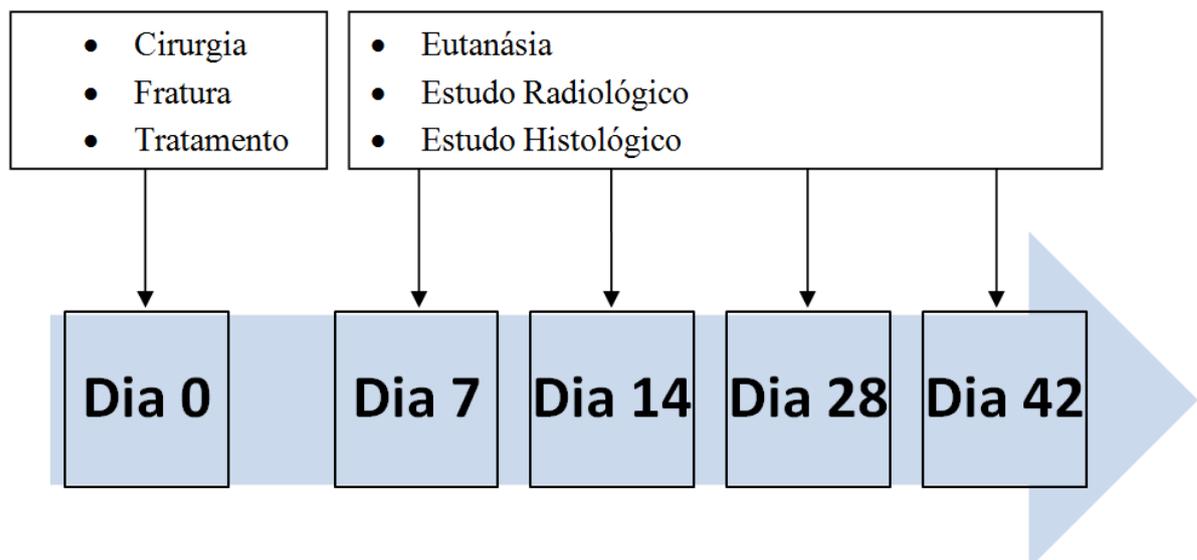


FIGURA 2 – Delineamento do estudo que avaliou o efeito do ibandronato de sódio na consolidação de fraturas de fêmur em ratos submetidos à osteossíntese intramedular.

3.5 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi padrão para todos os animais e o material utilizado no processo cirúrgico foi esterilizado em autoclave e utilizado em apenas um animal.

Os animais não foram submetidos a jejum pré-operatório de 12 horas e a anestesia utilizada foi via intramuscular na coxa esquerda de cloridrato de cetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg) (GOSS-SAMPSON.; KRISS, 1991). O animal foi considerado anestesiado quando se apresentava imóvel ao manuseio, com ausência de resposta a estímulos nociceptivos e mantendo frequência e amplitude respiratórias normais. Já anestesiado, foi tricotomizado manualmente na região do joelho direito, posicionado em decúbito dorsal em mesa operatória, realizada a anti-sepsia do membro pélvico direito, quadril direito, região inguinal e abdominal direita com Polivinilpirrolidona - iodo tópico e foi sobreposto o campo cirúrgico fenestrado estéril com orifício centralizado no quadril.

Fez-se uma incisão longitudinal anterior de 2 cm centrada na articulação do joelho direito estando o mesmo em flexão. A diérese foi realizada por planos teciduais até visualização da patela, do tendão patelar e do músculo quadríceps. Nova incisão foi realizada ao nível da borda medial da patela com prolongamento distal e proximal de no máximo 1cm na borda medial do tendão patelar. Uma dissecação subtendinosa cuidadosa preservando o aparelho extensor foi realizada (Figura 3) e com joelho em extensão em um movimento contínuo e suave realizava-se sua flexão e a patela foi luxada lateralmente para visualizar a região intercondiliana do fêmur direito e a incisura intercondilar (Figura 4).

Posicionando-se uma agulha de *intracath*, 1,2 x 64 mm, em um local 0,5 mm proximal ao vértice da incisura intercondilar, proporcionou a feitura de um túnel no canal medular do fêmur direito sem realizar falso trajeto (Figura 5).



FIGURA 3 – Incisão centrada no joelho e dissecação subtendinosa do tendão patelar.



FIGURA 4 – Visualização da região intercondiliana do fêmur direito e a incisura intercondilar.



FIGURA 5 – Confecção de um túnel no canal medular do fêmur direito com *intracath*

Após a confecção do túnel foi introduzido no canal medular, por via retrógrada, um fio de *Kirschner* (Biomecânica®) de 1 x 60 mm, manualmente, até ultrapassar o trocânter maior e exteriorizar-se na pele (Figura 6). Para evitar a migração, uma angulação de 90° foi realizada na extremidade proximal do fio e posteriormente sepultado abaixo da pele (Figura 7). A extremidade distal do fio de *Kirshner* exteriorizada no intercôndilo foi tracionada com firmeza para que ocorresse uma ancoragem da extremidade proximal no grande trocânter (Figura 8). Após a tração, realizou-se o corte do fio rente aos côndilos femorais. O fio *de Kirshner* foi então deixado no canal medular, sendo utilizado como uma haste intramedular, apoiada no trocânter maior. A patela foi reduzida a posição anatômica e foi realizado a síntese dos tecidos por planos anatômicos com fios cirúrgicos para sutura tipo *mononylon* 4.0.

No pós-operatório, os animais, de ambos os grupos, receberam cloridrato de tramadol 10 mg / kg (JANG; JANG; LEE, 2010) diluído na água do bebedouro, por dois dias.



FIGURA 6 – Introdução de fio de *Kirschner* no fêmur direito por via retrógada



FIGURA 7 – Extremidade proximal do fio *Kirschner* angulada para evitar migração



FIGURA 8 – Tração do fio de *Kirschner* na extremidade distal

3.6 Indução da fratura

Para induzir uma fratura no fêmur do rato um aparelho de fraturas (Figura 9) que mimetiza ma guilhotina romba, foi confeccionado em aço. O aparelho é constituído de uma base (A), duas hastes cilíndricas (B e C), uma barra de aço deslizante (E) e uma barra de aço estabilizadora (H). A barra de aço deslizante tem uma massa total de 746 g e quando travada sua lâmina romba esta a uma altura de 274,3 mm (d) de sua porção mais inferior até a superfície mais baixa do canalete longitudinal (D2). Na Figura 9 a barra de aço deslizante (E) está travada, para melhor visualização. O canaleta transverso (D1) é o local em que o fêmur do animal é posicionado para ser submetido a fratura e o canaleta longitudinal (D2) acomoda lâmina romba (F) no momento do impacto.

A realização da fratura necessita que o animal esteja anestesiado e imediatamente após o procedimento cirúrgico foi o melhor momento. Com animal em decúbito ventral, posicionado no lado esquerdo do aparelho, o fêmur direito era acomodado no canaleta transverso. Para que o fêmur fique posicionado corretamente no canaleta transverso, o animal deveria ser estar paralelo em relação à lâmina romba, com a articulação do joelho em flexão na borda direita da plataforma, estando quadril em rotação externa e abdução, e a face posterior da coxa no interior do canaleta (Figura 10). Antes da barra de aço deslizante ser

travada, o pesquisador tem que se certificar que a lâmina romba atingirá a área a ser fraturada, só então é realizado o procedimento da trava da barra de aço deslizante e posterior soltura da mesma, que com a queda e com uma força de 7,32 newtons, fratura o fêmur. O pesquisador segura o animal ainda anestesiado durante todo o processo da indução da fratura.

Após a indução da fratura o animal foi avaliado, clinicamente, para verificar a existência de sinais de mobilidade na diáfise do fêmur direito a fim comprovar da fratura. Ainda anestesiado os animais foram avaliados radiograficamente em aparelho portátil de radiografias da marca Vetmax® modelo 80/20, em que foi usada película radiográfica marca Kodak® tamanho 180 x 240 mm, para confirmar a existência da fratura.



FIGURA 9 – Aparelho de fraturas. A: base; B e C: hastes cilíndricas; D: plataforma; D1: canaleta transversal; D2: canaleta longitudinal; E: barra de aço deslizante; F: lâmina romba; G: trava; H: barra de aço estabilizadora; d: altura da lâmina romba (274,3mm).



FIGURA 10 – Posicionamento adequado do fêmur direito no canaleta transversal do aparelho de fraturas.

3.7 Tratamento

Após a total recuperação anestésica foi administrado pela técnica de gavagem 1,0 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% aos animais do grupo controle e no grupo ibandronato foi administrado, também por gavagem, ibandronato de sódio (bonviva® 150mg) diluído em água pura na dosagem de 15mg/Kg (LALA *et al*, 1998). Foram observados os cuidados recomendados para o uso dos bisfosfonatos de administração oral em que era realizado em jejum, o medicamento foi diluído em água pura e a alimentação só era permitida 1 hora após a administração do medicamento. Até o dia da eutanásia, foi permitido a deambulação dos animais.

3.8 Estudos radiográficos

Após a eutanásia dos animais de cada subgrupo, as coxas operadas foram cuidadosamente dissecadas com o intuito de remover a cobertura de partes moles do fêmur, tendo o cuidado de preservar o calo ósseo e o fio de *Kirschner*. Após o fêmur ser

desarticulado do quadril e joelho, foi imediatamente acondicionado em tubos de ensaio tipo *Falcon* de 15 ml com solução de formol a 10 %. As peças anatômicas então foram submetidas a exame radiográfico em um mamógrafo Alfa ST da marca GE®. Foi utilizada uma película de mamógrafo 18 x 24 centímetros a qual era submetida a técnica de exposição à radiação de 22 quilovolts (Kv), 20 miliampers (mAs) e tempo 0,71 de segundo, com a magnificação de 1.6. O tubo do mamógrafo estava posicionado verticalmente e as peças anatômicas organizadas em uma bandeja do aparelho a 20 cm do foco de emissão dos raios x, com as suas faces anteriores direcionadas para o foco e as cabeças dos fêmures apoiadas na bandeja e direcionadas para a esquerda, na distância de 21 cm do filme e a 2,5 cm entre peças.

As digitalizações das radiografias realizadas foram conseguidas através de um microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M90®) equipado com uma câmera de vídeo analógica (Hitachi®) do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), em que o sinal desta câmera era enviado para uma placa de captura externa (Pixelview®, modelo *play Tv Box 4*) e desta ao notebook (Compac®, modelo Presario C765BR). Previamente foi instalado no notebook um *software* (TV Jukebox®) para captura das imagens. A película de mamografia era posicionada em um negatoscópio de mesa telepanorâmico da marca VH® com lâmpada fluorescente de 8 watts, com a face brilhante voltada para cima e as imagens com a numeração das peças para esquerda. O microscópio cirúrgico era posicionado sob a imagem de cada peça com um aumento de 10 vezes e então era digitalizada a região do foco de fratura que estava centralizada na imagem. As imagens eram capturadas no formato Windows® Bitmap (BMP), com as dimensões de 640 x 480 *pixels*.

A figura 11 mostra a radiografia feita da peça anatômica do grupo Ibandronato, no 7º dia de consolidação óssea com a película na posição para a digitalização no microscópio cirúrgico.

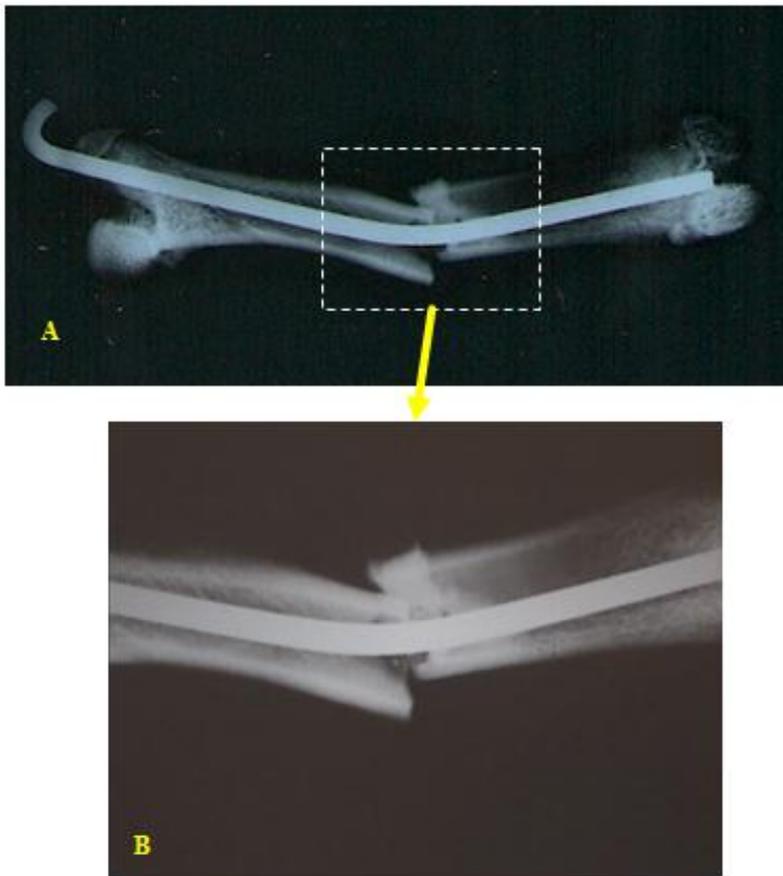


FIGURA 11 – Estudo radiográfico. A: Radiografia da peça anatômica número 1 do grupo Ibandronato, 7º dia de consolidação óssea. O tracejado em branco mostra a região a ser digitalizada no microscópio cirúrgico. B: Região da peça número 1 do grupo Ibandronato, 7º dia de consolidação óssea, já digitalizada no microscópio cirúrgico com um aumento de 10x.

Após a digitalização das imagens radiográficas, a análise do calo ósseo em cada imagem foi realizado com um *software* chamado de SAMM (Sistema de Análise Morfométrica) desenvolvido do Programa de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e modificado para este fim (JAMACARU, 2006). Este *software* fornecia dois dados: a densidade óptica e a área do calo ósseo. A densidade óptica é quantificada através da média dos níveis de cinza, e o tamanho da área do calo ósseo é aferida em mm². Níveis de cinza é uma escala utilizada na computação, onde o preto absoluto é 0 e o branco absoluto é 255, e cada número neste intervalo corresponde a um tom de cinza, não há unidade de medida para esta quantificação. A média destes níveis de cinza foi calculada pelo programa em toda a área de interesse, o que corresponde à densidade óptica do calo ósseo, quanto mais perto do branco (255) esta média se encontra, mais radiopaco é o exame radiográfico, ou seja, mais consolidado o calo ósseo esta.

A análise radiológica do calo ósseo começa com seleção da área de interesse na imagem, marcada em verde, e após selecionar a área de interesse é realizada a quantificação da área do calo ósseo em mm² e a média dos níveis de cinza, em azul (Figura 12). Para permitir uma melhor análise foi primeiro estudado o calo da região superior da imagem e posteriormente realizado o estudo do calo da região inferior da imagem. Para a determinação da densidade óptica do calo, calculou-se a média aritmética da média dos níveis de cinza das regiões superior e inferior da imagem e para a determinação da área do calo ósseo as áreas dos calos ósseos da região inferior e superior da imagem foram somadas.

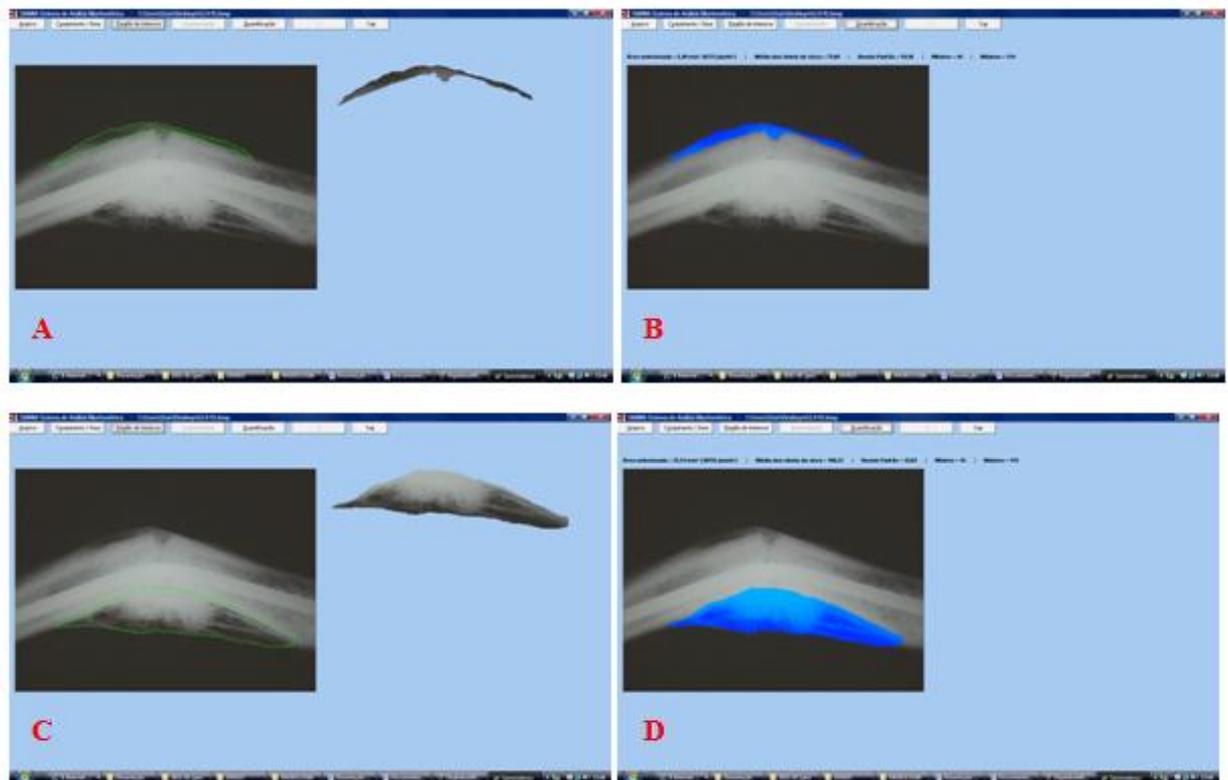


FIGURA 12 – Análise das imagens radiográficas com o SAMM na peça número 1 do grupo Ibandronato, no 42° dia de consolidação óssea. A: Seleção da área interesse no calo ósseo na região superior da imagem. B: Quantificação da área do calo ósseo e da densidade óptica do calo ósseo na região superior da imagem. C: Seleção da área de interesse no calo ósseo na região inferior da imagem. D: Quantificação da área do calo ósseo e da densidade óptica do calo ósseo na região inferior da imagem.

3.9 Estudos histológicos

As peças após a realização das radiografias foram submetidas à descalcificação com utilização de ácido nítrico a 7,5% até o momento em que era possível introduzir sem resistência uma agulha na peça. Após este período os fios de *Kirschner* eram removidos e as peças eram cortadas primeiro transversalmente, 0,5 cm proximal ao foco da fratura e 0,5 cm distal ao foco da fratura para selecionar apenas o calo ósseo e a região próxima à fratura. Depois era realizado um corte longitudinalmente dividindo em metades o calo ósseo e a região próxima à fratura. As metades foram impregnadas com parafina, o bloco de inclusão foi levado ao micrótomo, onde foi feito cortes longitudinais de 5 micrômetros de espessura. Os cortes foram corados pelo método de picosirius (EasyPath®, Milão, Itália) para avaliação das fibras de colágeno. Após a confecção das lâminas a análise histológica foi realizada utilizando-se um microscópio óptico com luz polarizada (N-200T, Coleman, São Paulo, Brasil), para verificar a birrefringência do colágeno tipo I e do colágeno tipo III no calo ósseo e na cortical próxima a fratura.

As imagens das lâminas foram capturadas e digitalizadas do microscópio óptico por uma câmera fotográfica digital da marca *Sony*®, modelo *Cyber-shot* DSC-W55, ajustando suas configurações para padronização das imagens (modo ISO: alta sensibilidade), assim como a intensidade da luz do microscópio e magnificação (100 vezes). As imagens digitais foram capturadas no formato JPG e armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP), com as dimensões de 640 x 480 *pixels*, utilizando para isso um software, IrfanView®.

Para realização do estudo histológico foram selecionadas áreas específicas em cada lâmina que correspondiam ao calo ósseo, na região inferior da imagem e na região superior da imagem e as corticais do fêmur próximas a fratura, uma cortical a direita do foco de fratura e outra cortical a esquerda do foco de fratura (Figura 13).

Sob a luz polarizada, as regiões a serem digitalizadas apresentam as fibras de colágeno em intensa birrefringência diferenciando as fibras do colágeno tipo I que adquirem uma coloração entre o amarelo e o vermelho e as fibras do colágeno tipo III, uma coloração que varia entre o verde e o amarelo esverdeado (MONTES; JUNQUEIRRA, 1991).

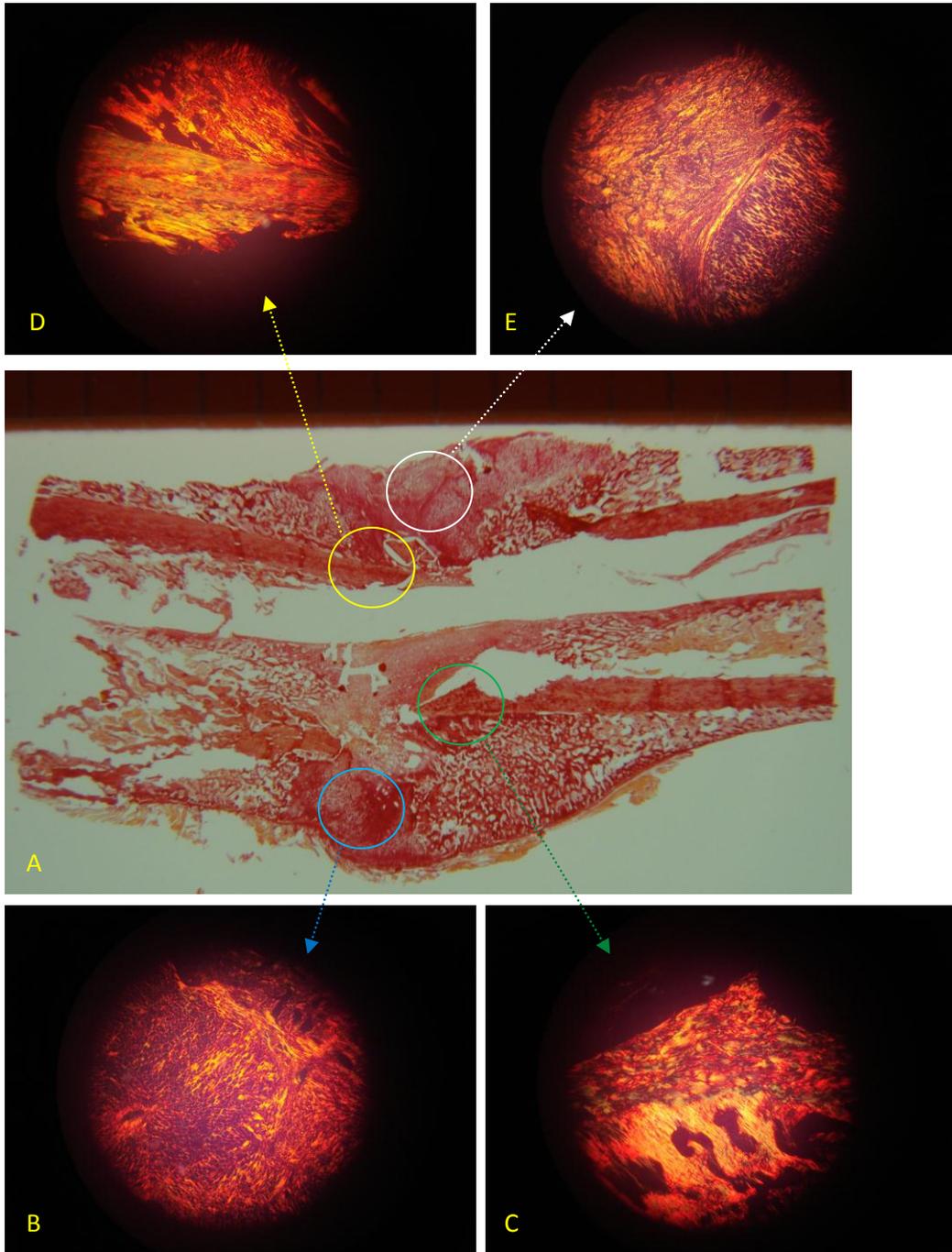


FIGURA 13 – Estudo histológico. A: microfotografia (milimetrada) do calo ósseo de fratura de fêmur da peça número seis do grupo Ibandronato no 14º dia de consolidação óssea coradas pelo *picrossirius*. Os círculos coloridos marcam as áreas a serem fotografadas. Círculo azul delimita a área do calo ósseo da região inferior da imagem, círculo verde delimita a área da cortical inferior da imagem, círculo amarelo delimita a área da cortical superior da imagem, círculo branco delimita a área do calo superior da imagem. B: área do calo ósseo na região inferior da imagem digitalizada sob a microscopia de luz polarizada aumento 100x. C: área da cortical na região inferior da imagem digitalizada sob a microscopia de luz polarizada aumento 100x. D: área da cortical na região superior da imagem digitalizada sob a microscopia de luz polarizada aumento 100x. E: área do calo ósseo na região superior da imagem digitalizada sob microscopia de luz polarizada aumento 100x.

O exame quantitativo de colágeno foi realizado utilizando um programa informatizado de análise de imagens (Sistema de Análise Morfométrica – SAMM), desenvolvido especificamente para este fim (JAMACARU, 2006). Foram realizadas medidas em *pixels* dos feixes que representavam a birrefringência nas regiões em estudo de cada lâmina. Essas medidas foram obtidas por meio da diferença de coloração detectada pelo programa, que foi calibrado para identificar o espectro de cores relativo ao colágeno tipo I e ao colágeno tipo III corados com *picrosirius*. O programa segmentava automaticamente as estruturas de interesse na imagem e quantificava o percentual destas estruturas em relação à área do campo estudado (Figura 14).

3.10 Análises estatísticas

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valores mínimos e máximos (dados não paramétricos). Comparações intergrupos (controle *versus* Ibandronato) em cada tempo estudado foram feitas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas (dados paramétricos) ou do teste de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas). Comparações intragrupos, ou seja, entre os quatro tempos ou subgrupos (dias 7, 14, 28 e 42) num mesmo grupo, foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey (dados paramétricos) ou pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas) (ARMITAGE; BERRY, 1994; MOTULSKY, 1995).

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significante um valor *P* menor que 0,05.

O *software* GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

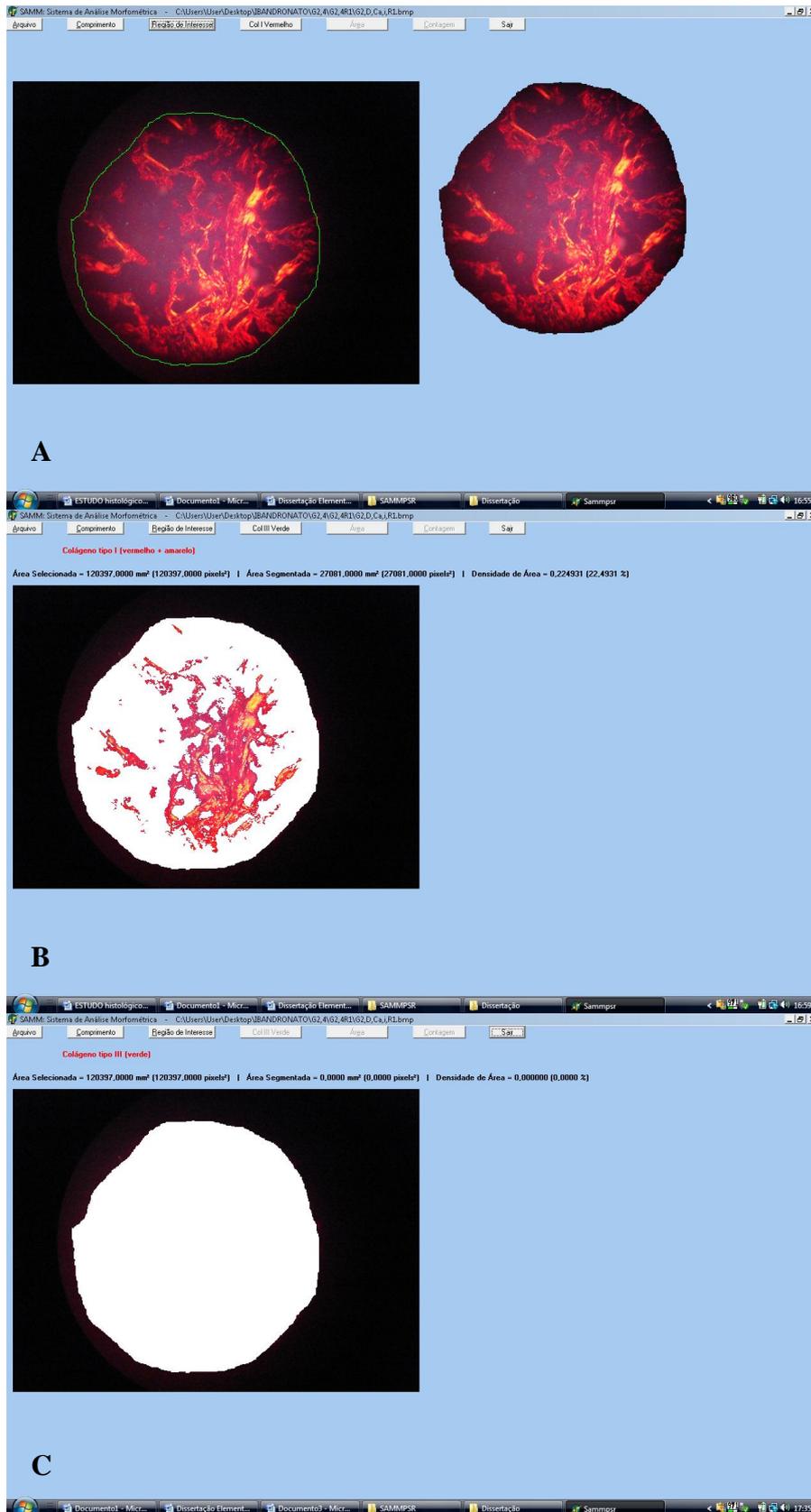


FIGURA 14 – Análise das imagens histológicas com o SAMM. Quantificação do colágeno no calo ósseo, grupo Ibandronato 42º dia de consolidação óssea . A: seleção da região de interesse. B: aferição da densidade de área do colágeno tipo I (vermelho + amarelo) C: aferição do colágeno tipo III (verde), neste caso ausente.

4 RESULTADOS

Não foi verificado casos de infecção e falha na osteossíntese nos grupos Controle e Ibandronato.

4.1 Estudos radiográficos

4.1.1 Área do calo ósseo

A média da área do calo ósseo aumentou nos grupos estudados no decorrer do período, apresentando maiores valores no 42º de consolidação óssea com $12,4 \pm 6,5 \text{mm}^2$ no grupo Controle e $17,17 \pm 5,74 \text{mm}^2$ no grupo Ibandronato. Embora ocorresse diferenças na análise entre grupos, estas diferenças não eram estatisticamente significantes (Tabela 1).

Quando se procedia à análise no mesmo grupo verificou-se que no grupo Controle as áreas do calo mensuradas nos dias 28(+P<0,05) e 42(+P<0,01) foram significativamente maiores que aquelas mensuradas no dia 7. Na análise no grupo Ibandronato nos dias 14(*P<0,05), 28(***P<0,001) e 42(***P<0,001) a área do calo foi significativamente maior que no dia 7, podendo-se observar também que o dia 42(###P<0,001) foi estatisticamente maior que o dia 14 (Figura 15).

A figura 16 ilustra de forma comparativa a evolução de formação do calo ósseo nas radiografias digitalizadas no microscópio cirúrgico da peça de número 1 nos tempos estudados, nos dois grupos.

Tabela 1: Valores da média e desvio padrão da área do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Ibandronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	0,65	0,27	0,55	0,18	P=0,4743
14	8,77	6,43	6,82	1,91*	P=0,4924
28	10,36#	5,01	11,51	4,71‡	P=0,6922
42	12,94†	6,85	17,17	5,74‡§	P=0,2731
Significância (intragrupo)	F=5,9691	P=0,0045	F=20,3180	P<0,0001	

#P < 0,05 versus Dia 7 no grupo Controle; †P < 0,01 versus Dia 7 no grupo Controle; *P < 0,05 versus Dia 7 no grupo Ibandronato; ‡P < 0,001 versus Dia 7 no grupo Ibandronato; §P < 0,001 versus Dia 14 no grupo Ibandronato (teste de Tukey).

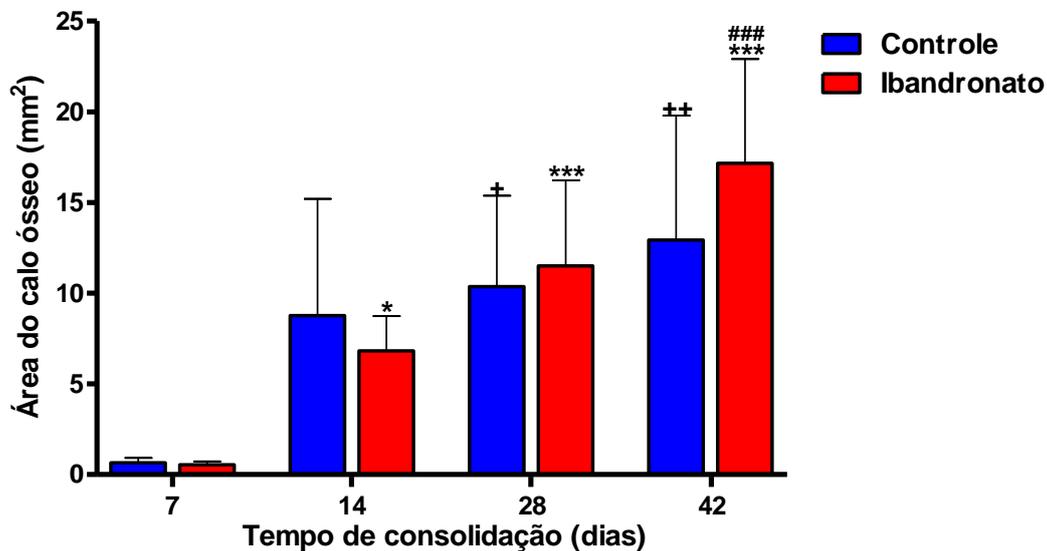


FIGURA 15 - Área do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em fêmures de 6 animais (dias 7, 14, 28 e 42) de ambos os grupos.; +P < 0,05, ++P < 0,01 em relação ao dia 7 no mesmo grupo; *P < 0,05, ***P < 0,001, ****P < 0,001 em relação ao dia 7 do mesmo grupo; ###P < 0,001 em relação ao dia 14 do grupo Ibandronato.

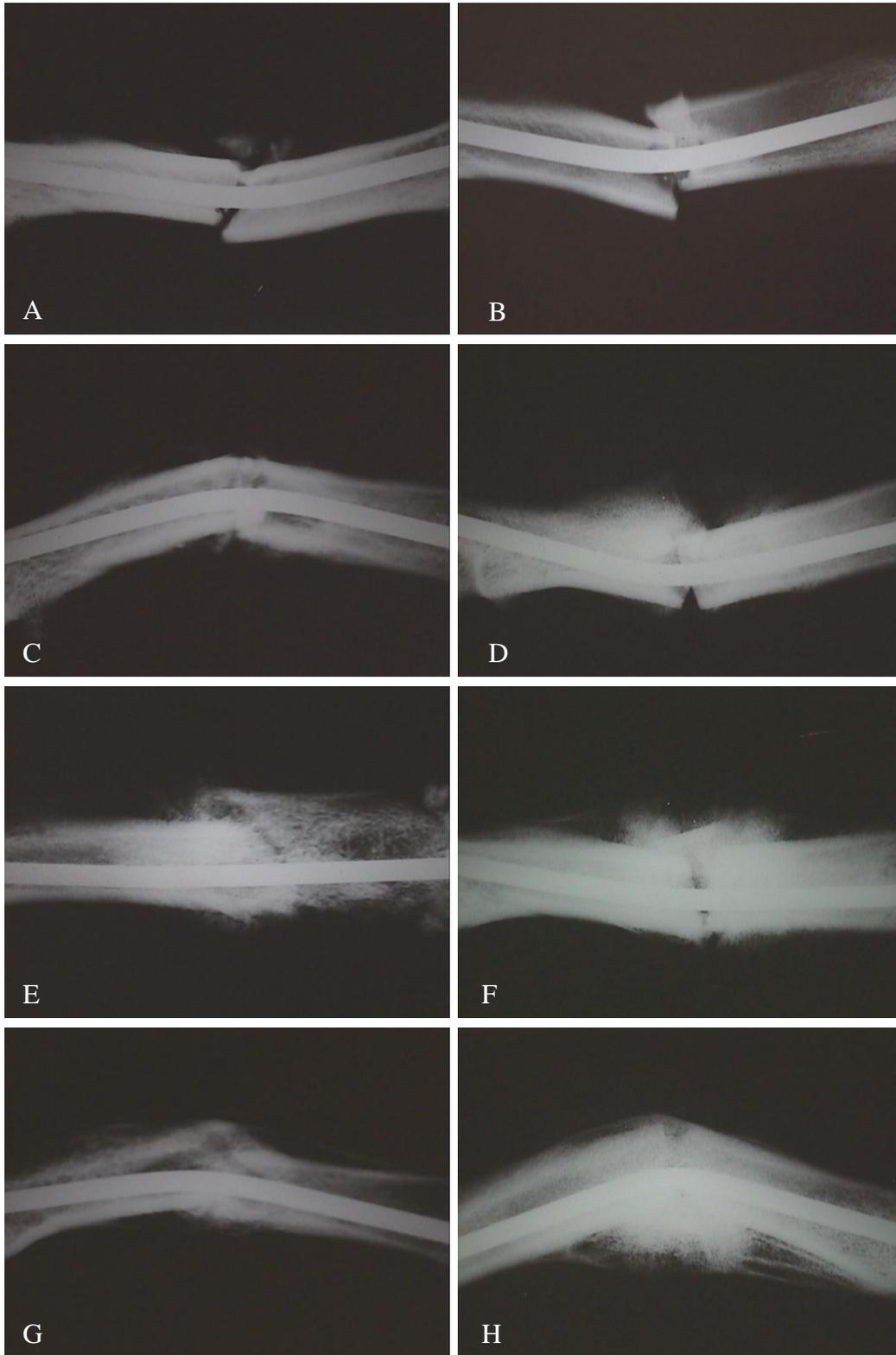


FIGURA 16 – Imagens radiográficas digitalizadas no microscópio cirúrgico das peças número 1 nos tempos estudados dos grupos Controle e Ibandronato . A, C, E e G são radiografias do grupo Controle. B, D, F e H são radiografias do grupo Ibandronato. A e B são as radiografias no 7º dia de consolidação óssea. C e D são as radiografias no 14º dia de consolidação óssea. E e F são as radiografias no 28º dia de consolidação óssea. G e H são as radiografias no 42º dia de consolidação óssea. Aumento 10x.

4.1.2 Densidade óptica do calo ósseo

Na análise entre os grupos foi possível constatar que no grupo Ibandronato, dia 42(**P=0,0056), a densidade óptica foi estatisticamente maior que no grupo controle. As comparações no mesmo grupo não mostraram diferenças estatísticas significantes (Figura 17).

TABELA 2 – Valores da média e desvio padrão da densidade óptica do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Ibandronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	60,40	5,98	67,37	8,32	P=0,1264
14	68,15	12,61	79,10	13,60	P=0,1789
28	70,25	8,77	74,32	6,49	P=0,3820
42	63,59	7,63	81,62	9,99	P=0,0056
Significância (intragrupo)	F=1,4359	P=0,2620	F=2,3776	P=0,1002	

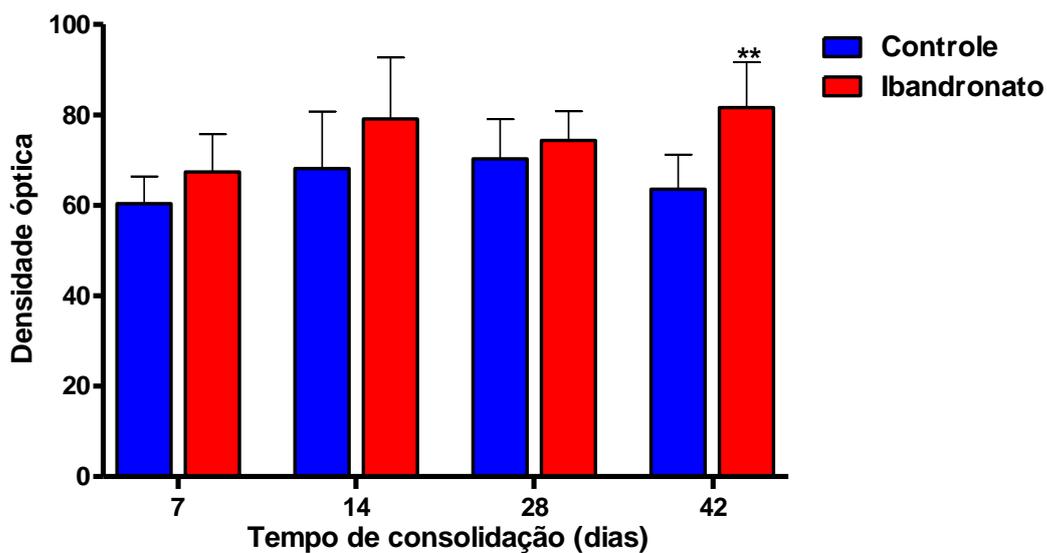


FIGURA 17 - Densidade óptica do calo ósseo mensurada nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em fêmures de 6 animais (dias 7, 14, 28 e 42) de ambos os grupos. **P = 0,0056 em relação ao grupo controle.

4.2 Estudos histológicos

4.2.1 Densidade do colágeno tipo I no calo ósseo

No calo ósseo, a densidade de colágeno tipo I foi maior nas duas primeiras semanas de consolidação óssea no grupo Ibandronato. A análise entre grupos mostra claramente que no 7º dia (*P = 0,0292) e no 14º dia (**P = 0,0008) do grupo Ibandronato ocorreu uma maior densidade de colágeno tipo I, estatisticamente significativa, que no grupo Controle (Figura 18).

As médias das densidades de colágeno tipo I no calo ósseo no grupo controle foram maiores nos dias 28 (37,32±22,28) e 42 (36,22±14,29), todavia, nas comparações dentro do mesmo grupo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados (Tabela 3).

TABELA 3 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na região do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Ibandronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	17,89	13,03	35,96	11,54	P=0,0292
14	17,83	13,21	48,13	3,52	P=0,0008
28	37,32	22,28	43,62	5,36	P=0,5160
42	36,22	14,29	39,22	8,74	P=0,6696
Significância (intragrupo)	F=2,7431	P=0,0701	F=2,3554	P=0,1042	

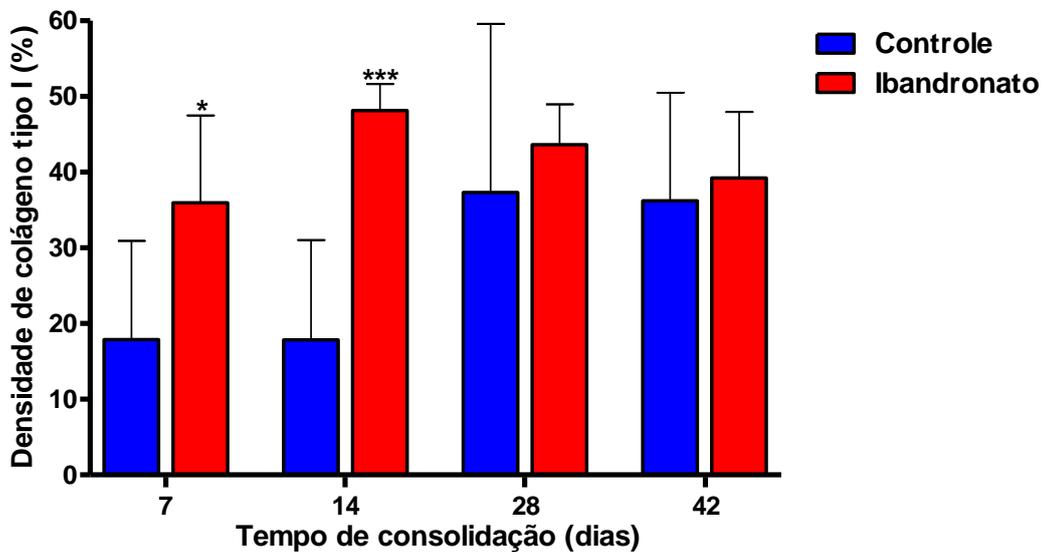


FIGURA 18 - Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em preparados histológicos de 6 animais (dias 7, 14, 28 e 42) de ambos os grupos *P = 0,0292; ***P = 0,0008 em comparação com o grupo controle.

4.2.2 Densidade de colágeno tipo I na cortical

Na cortical próxima ao foco de fratura, a densidade de colágeno tipo I na análise entre grupos, o grupo Ibandronato no dia 7(**P<0,0036) foi estatisticamente maior que no grupo Controle (Figura 19).

No grupo controle as médias da densidade do colágeno tipo I nos dias 14(48,22±25,11), 28(55,36±14,54) e 42(50,53±18,07) formam maiores que no dia 7(18,30±23,64) porém só foi estatisticamente significativa dia 28(*P<0,05). No grupo Ibandronato não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 4).

A Figura 20 ilustra de forma comparativa a evolução de formação do calo ósseo, na microscopia sob luz polarizada, na peça de número 1 nos tempos estudados, nos dois grupos.

TABELA 4 – Valores da média e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I na cortical próxima ao foco de fratura, referentes às aferições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Ibandronato		Significância (intergrupos)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
7	18,30	23,64	55,91	5,72	P=0,0036
14	48,22	25,11	60,69	15,79	P=0,3274
28	55,36*	14,54	52,52	14,79	P=0,7444
42	50,53	18,07	58,63	9,66	P=0,3555
Significância (intragrupo)	F=3,9209	P=0,0237	F=0,5050	P= 0,6832	

*P < 0,05 versus D7 no grupo Controle (teste de Tukey).

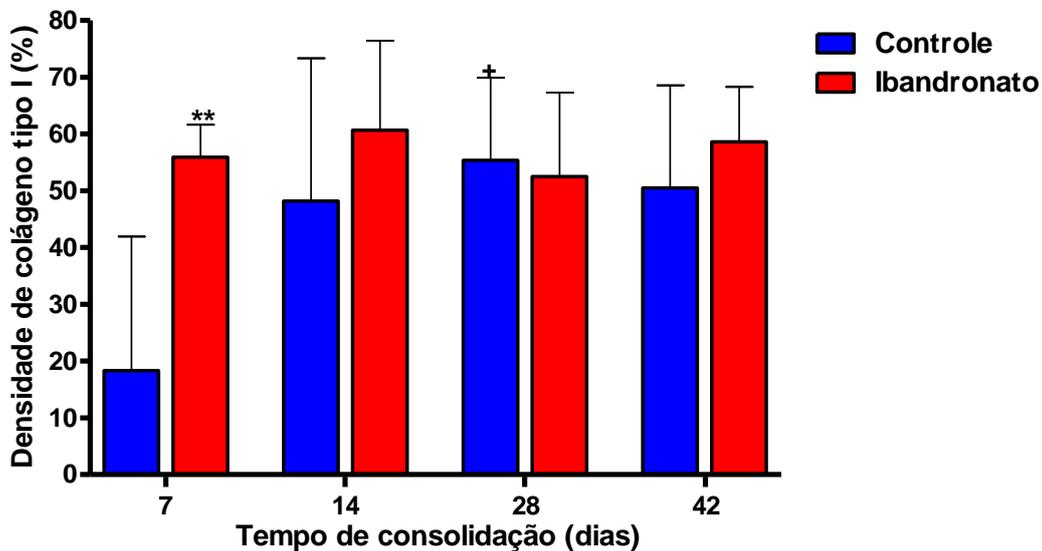


FIGURA 19 - Densidade de colágeno tipo I, expressa em termos percentuais, mensurada na cortical próxima ao foco de fratura, nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea. Os dados correspondem à média e desvio padrão das aferições efetuadas em preparados histológicos de 6 animais (dias 7, 14, 28 e 42) de ambos os grupos **P = 0,0036 em relação ao grupo controle; +P < 0,05 em relação ao dia 7 do grupo Controle.

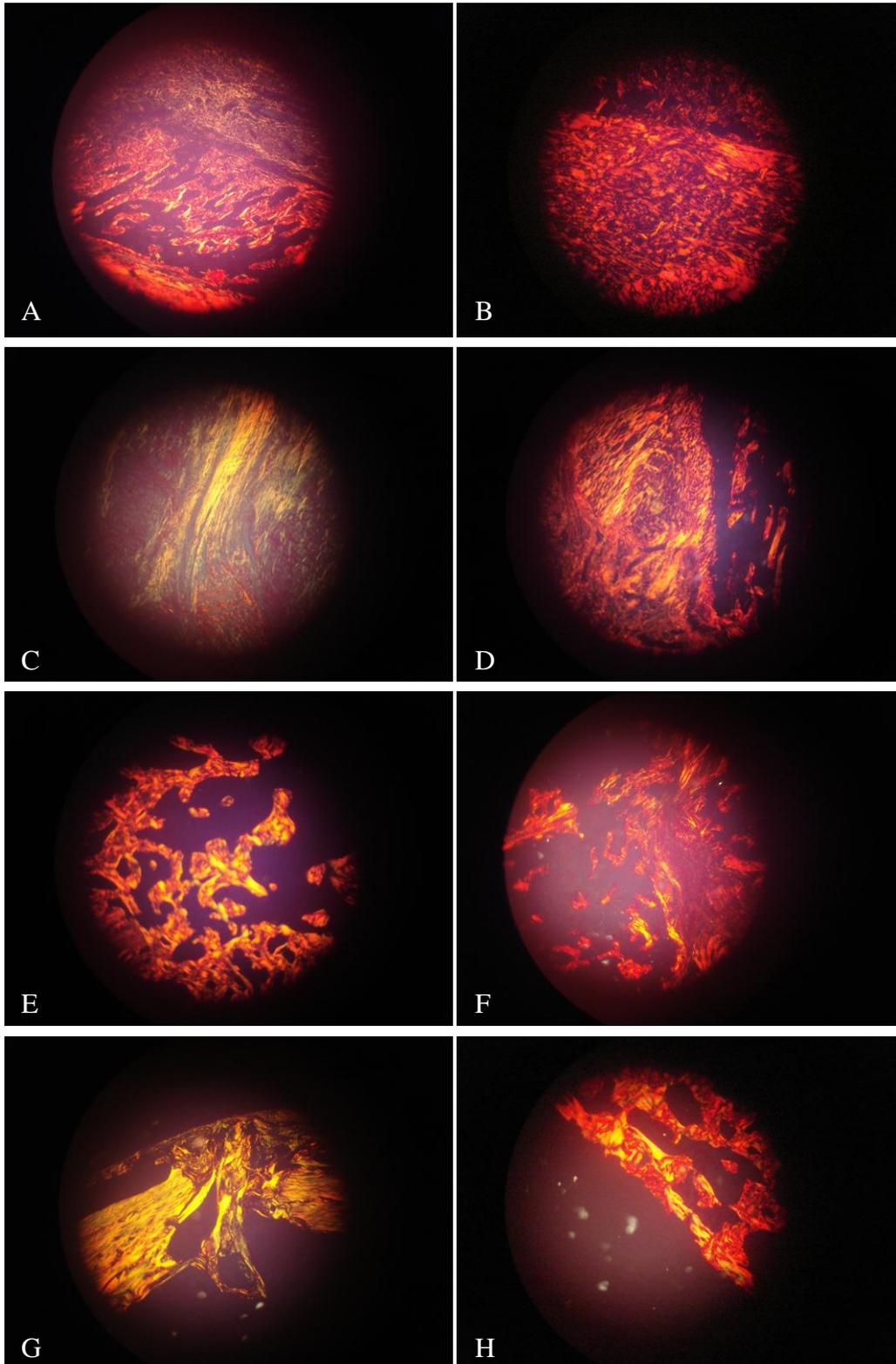


FIGURA 20 – Imagens histológicas digitalizadas no microscópio sob luz polarizada dos calos ósseos das peças número 1, nos tempos estudados dos grupos Controle e Ibandronato . A, C, E e G são calos ósseos do grupo Controle. B, D, F e H são calos ósseos do grupo Ibandronato. A e B são calos ósseos no 7° dia de consolidação óssea. C e D são calos ósseos no 14° dia de consolidação óssea. E e F são calos ósseos no 28° dia de consolidação óssea. G e H são calos ósseos no 42° dia de consolidação óssea. Aumento 100x.

4.2.3 Densidade de colágeno tipo III no calo ósseo

Na análise intergrupos, constatou-se que, no dia 7(**P = 0,0022) a densidade de colágeno tipo III verificada no grupo Ibandronato foi significativamente menor que a observada no grupo Controle (Figura 21).

Entretanto, nas comparações dentro do mesmo grupo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos estudados

TABELA 5 – Valores da mediana e intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75) da densidade de colágeno tipo III na região do calo ósseo referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Ibandronato		Significância (intergrupos)
	Mediana	Intervalo interquartil	Mediana	Intervalo interquartil	
7	4,40	1,44 – 27,43	0,00	0,00 – 0,01	P=0,0022
14	8,35	3,51 – 17,19	0,06	0,04 – 0,42	P=0,0649
28	0,50	0,01 – 6,25	0,20	0,00 – 1,44	P=0,5725
42	3,71	1,18 – 1,44	0,51	0,00 – 2,22	P=0,0649
Significância (intragrupo)	KW=3,1400	P=0,3705	KW=6,5942	P=0,0860	

KW: Estatística de Kruskal-Wallis.

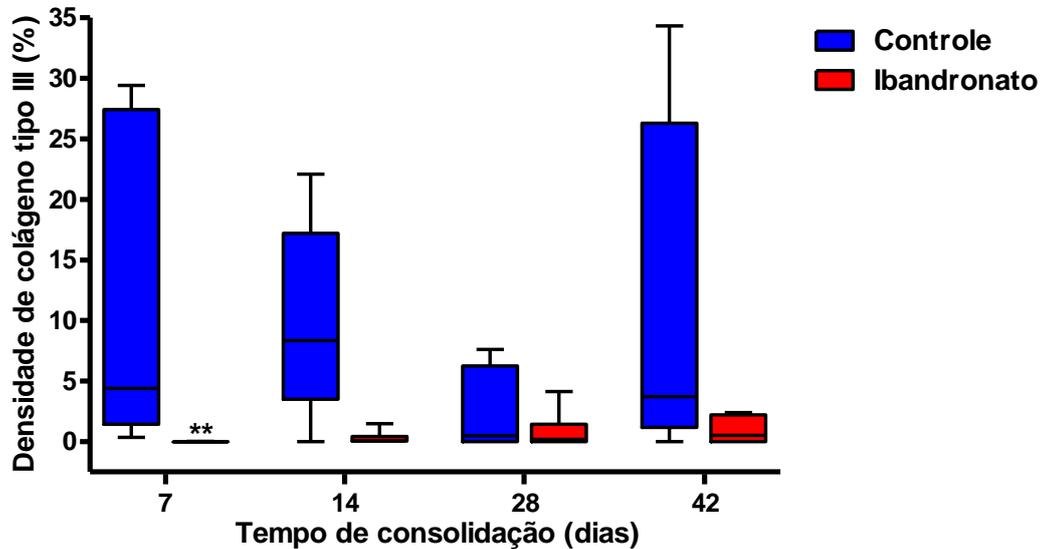


FIGURA 21 - Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na região do calo ósseo nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea. Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em preparados histológicos de 6 animais (dias 7, 14, 28 e 42) de ambos os grupos. $**P = 0,0022$ em relação ao dia 7 do grupo Controle.

4.2.3 Densidade de colágeno tipo III na cortical

Na análise intergrupos, constatou-se que a densidade de colágeno tipo III verificada no grupo Ibandronato foi significativamente menor nos dias 7 ($**P = 0,0022$) e 14 ($*P = 0,0152$) quando compara com o grupo Controle.

Nas comparações dentro do mesmo grupo, verificou-se que, no grupo Controle, a densidade de colágeno tipo III mensurada no dia 28 ($+P < 0,05$) foi significativamente menor que a observada no dia 14. Contrariamente, no grupo Ibandronato, a densidade de colágeno tipo III mensurada nos dias 14 ($\#P < 0,05$) e 42 ($\#P < 0,05$) foi significativamente maior que a observada no dia 7 (Figura 22).

TABELA 6 – Valores da mediana e intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75) da densidade de colágeno tipo III na cortical próxima ao foco de fratura referentes às aferições efetuadas nos animais dos grupos Controle e Ibandronato nos quatro tempos estudados (dias 7, 14, 28 e 42).

Tempo de consolidação (dias)	Controle		Ibandronato		Significância (intergrupos)
	Mediana	Intervalo interquartil	Mediana	Intervalo interquartil	
7	37,86	7,57 – 45,58	0,00	0,00 – 0,04	P=0,0022
14	59,77	27,78 – 65,17	2,41†	0,66 – 13,18	P=0,0152
28	1,18‡	0,00 – 16,63	3,05	0,59 – 9,38	P=0,8726
42	11,89	4,71 – 30,86	3,19†	2,34 – 10,86	P=0,2403
Significância (intragrupo)	KW=10,2667	P=0,0164	KW=11,8588	P=0,0079	

‡P < 0,05 *versus* D14 no grupo Controle; †P < 0,05 *versus* D7 no grupo Ibandronato (teste de Dunn); KW: Estatística de Kruskal-Wallis.

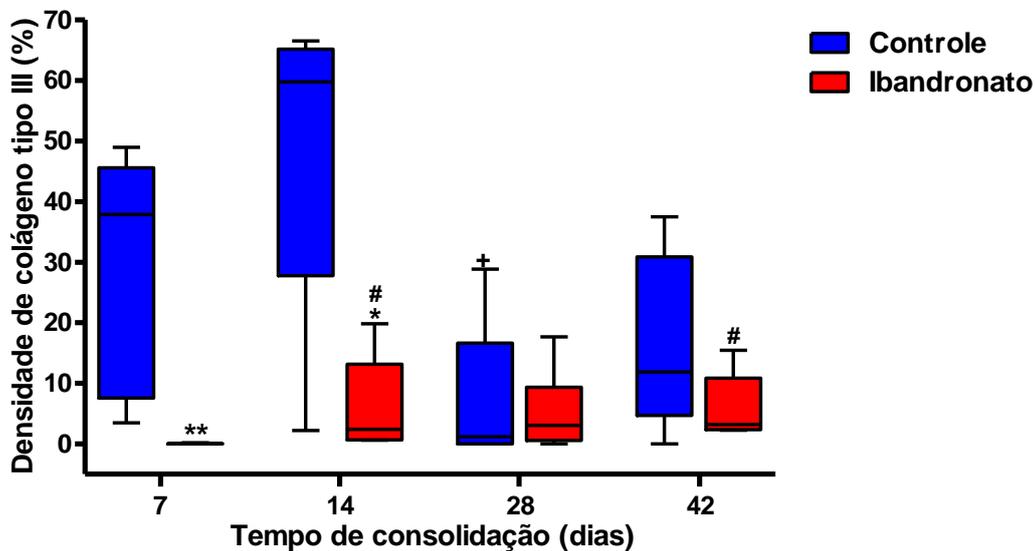


FIGURA 22 - Densidade de colágeno tipo III, expressa em termos percentuais, mensurada na cortical próxima ao foco de fratura nos grupos Controle e Ibandronato nos dias 7, 14, 28 e 42 de consolidação óssea. Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em preparados histológicos de 6 animais (dias 7, 14, 28 e 42) de ambos os grupos. **P = 0,0022, *P = 0,0152 em comparação com os dias 7 e 14 do grupo Controle respectivamente; +P < 0,05 em relação ao dia 14 do grupo controle ; #P < 0,05 em relação ao dia do grupo Ibandronato.

5 DISCUSSÃO

O estudo experimental da consolidação de fraturas em modelos animais tem sido usado em diferentes espécies. Os pequenos roedores tem a desvantagem de apresentar uma estrutura óssea primitiva sem o sistema Harversiano (KUPCZIK *et al*, 2009; NUNAMMAKER, 1998) mas apresenta as vantagens de ter uniformidade das amostras, ciclo de vida curto, custos e manejos acessíveis (MAINARDES *et al*, 2007) e características ósseas biomecânicas similares às do ser humano (KUPCZIK *et al*, 2009). O uso dos ratos da raça *Wistar, Rattus norvegicus albinus*, no presente estudo foi motivado por estas vantagens além de que vários artigos científicos têm usado este animal para estudar a consolidação de fraturas proporcionando possíveis comparações (CASTRO *et al*, 2005; GUARNIERO *et al*, 2007; KUPCZIK *et al*, 2009; MAINARDES *et al*, 2007; MENDES *et al*, 2001; MUSSI FILHO *et al*, 2006).

O período de tempo para realizar o estudo das fases da consolidação óssea foi definido com base no trabalho de Udupa e Prasad (1963) em que foram realizados estudos químicos e histoquímicos dos constituintes orgânicos no reparo de fraturas e úmero em ratos durante seis semanas e no trabalho de Castro *et al* (2005), em que se estudou o processo de consolidação óssea (avaliação radiológica e histológica) de fraturas de tíbia de ratos tratados com acetaminofen. Nesses trabalhos eles documentaram a evolução histológica no reparo ósseo em ratos e observaram que na primeira semana ocorre a proliferação de fibroblastos, na segunda semana pós fratura há o aparecimento de tecido fibrocartilagenoso com focos de cartilagem hialina, na quarta semana existe a substituição do tecido cartilagenoso por tecido ósseo e na sexta semana o predomínio do tecido ósseo maduro sobre o cartilagenoso é evidente. Udupa e Prasad (1963) concluíram que na segunda semana, fase do colágeno, há um aumento no conteúdo do colágeno, na terceira e quarta semanas há uma diminuição aparente deste conteúdo devido a deposição de fosfato de cálcio e que na fase de remodelação, quinta e sexta semanas, o conteúdo de colágeno tende a voltar ao normal. Einhorn (2005) sumariza os eventos celulares e moleculares no processo de consolidação endocondral de fraturas transversas de fêmur de ratos e os descreve e ilustra até o 35° dia. Giordano *et al* (1999) acreditam que o tempo mínimo para observação da consolidação em ratos adultos é de seis semanas e propõe o trabalho de Udupa e Prasad (1963) para realizar a eutanásia dos seus animais.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos e induções das fraturas nos fêmures foi utilizado anestesia com cloridrato de cetamina (90 mg / Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg / Kg) por via intramuscular (GOSS-SAMPSON; KRISS, 1991). A anestesia mostrou-se segura pois somente um animal morreu durante o procedimento cirúrgico e é eficaz pois r os procedimentos cirúrgicos e a indução das fraturas foram realizados sem sofrimento adicional para os animais.

O procedimento cirúrgico realizado permitiu a osteossíntese prévia a indução de fraturas e já foi muito bem documentado (AZUMA *et al.* 2001; KUPCZIK *et al.*, 2009; MUSSI FILHO *et al.* ,2006). No presente estudo não ocorreu perda da fixação óssea pós fratura ou migração do fio de Kirschner. A fresagem manual do canal medular com *intracath*, ao invés do uso do perfurador elétrico, permitiu melhor controle na confecção do túnel no canal medular minimizando a possibilidade de realização de falso trajeto e sem prejuízo para a consolidação das fraturas. Grundnes, Utuvag e Reikeras (1994) concluíram que a fresagem medular moderada permite restabelecimento do fluxo sanguíneo ósseo total e cortical em 24 horas

No pós operatório imediato e até 48 horas era ofertado aos animais um analgésico, cloridrato de tramadol, na dose 10mg/Kg (JANG *et al.* ,2010), diluído na água do bebedouro. Os animais deambulavam desde o primeiro dia de pós-operatório sem restrições.

Para realização da fratura foi confeccionado um aparelho de fraturas em que o principio de funcionamento assemelha-se aos já bem documentados por Bonnarens e Einhorn (1984) e Vialle *et al.* (2004) em que uma lâmina romba atinge a área a ser fraturada após percorrer em queda livre uma determinada altura e através de uma flexão de três pontos é criada a fratura. Os aparelhos propostos por Bonnarens e por Vialle utilizavam peso de 500 g e o utilizado no presente trabalho, a barra de aço deslizante que contem a lâmina romba, pesa 746 g. Os trabalhos de Bonnarens e Vialle utilizaram os animais em posição supina com o quadril abduzido e o impacto da guilhotina romba ocorreu na face medial da coxa. O correto posicionamento do animal no canaleta transversa da plataforma foi crucial para localizar a fratura no fêmur. Após realização de disseções em coxas de ratos optamos pelo impacto lateral da lâmina romba na coxa do animal pois é na face medial que percorre os grandes vasos e nervos da coxa e em uma situação de trauma poderia ocorrer uma grande desvascularização e comprometer desta forma a consolidação da fratura.

A administração do ibandronato de sódio foi por gavagem após a realização e no mesmo dia do procedimento cirúrgico, estando animal acordado. O medicamento foi diluído

em água pura para não dificultar a sua absorção e só foi permitido a alimentação 60 minutos após a administração (BARRETT *et al.*, 2004). A dosagem foi de 15 mg/kg (LALA *et al.*, 1998), foi realizada dose única por ser de posologia cômoda e tão eficaz quanto o tratamento diário (REGINSTER *et al.*, 2006).

As radiografias dos fêmures foram realizadas em aparelho de mamografia pois a qualidade da imagem que a película de mamografia oferece é melhor do que as das radiografias simples . Os trabalhos mostram diferentes ajustes para exposição à radiação (GUARNIERO *et al.*, 2003; GUARNIERO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2001; POZENATO *et al.*, 2004) e a eleição do melhor ajuste no presente estudo foi baseado na melhor visualização do calo ósseo dos animais do grupo Controle no 14 ° dia de consolidação óssea pois nesta fase o calo ósseo apresentava-se mais exuberante e portanto melhor na avaliação comparativa de ajuste de exposição radiográfica. A presença do calo ósseo é observada na única incidência realizada, pelo aumento da densidade óssea na região externa da cortical lateral e medial próxima ao foco de fratura ,isto é, o calo periosteal (GREENSPAN, 1996). A densidade deste calo é visualizada em níveis de cinza que podem ser mais claro ou menos claro. A existência de níveis de cinza possibilitou o uso do SAMM.

No estudo histológico a técnica de coloração dos tecidos ósseos foi pelo método do micro-sirius (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979) que cora as fibras de colágeno. As fibras de colágeno representam 95% da parte orgânica da matriz óssea. O colágeno é produzido pelos osteoblastos e as fibras estando associadas à hidroxiapatita proporcionam resistência ao tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Sob a luz polarizada e coradas com o micro-sirius, as fibras de colágeno tornam-se birrefringentes, isto é tornam-se luminosas contra um fundo escuro. Em estudo dos tipos de fibra de colágeno, Montes e Junqueira (1991) observaram que colágenos tipo I, II, III mostravam diferentes cores e intensidades de birrefringência quando corados pelo picrosirius. O colágeno tipo I apresentava intensa birrefringência e cor que varia do amarelo ao vermelho, o colágeno tipo II, fraca birrefringência e cor variável, o colágeno tipo III, fraca birrefringência e cor esverdeada. Com esta possibilidade de individualizar os tipos de colágeno pela cor foi possível utilizar o software SAMM e quantificá-los.

O sistema de análise morfométrica (SAMM) versão 1.0, é um *software* que foi projetado para quantificação *in vivo*, em imagens digitalizadas, da angiogênese da córnea de coelhos (JAMACARU, 2006). Para o uso da quantificação do calo periosteal e colágenos, necessitou de ajustes que foram realizadas pelo desenvolvedor. O usuário tem fácil interação

com o software e tem pouca interferência nos módulos de processamento das imagens. Existem diferenças entre o SAMM utilizado para estudar as radiografias e daquele que estuda as lâminas. Nomeado pelo desenvolvedor de SAMMDENSO, esta variante do software quantifica o calo periosteal e o SAMMPCR quantifica os colágenos tipo I e III. Se no SAMMDENSO utiliza as escalas de cinza para quantificar o calo periosteal o SAMMPCR utilizará as cores vermelho e amarelo para quantificar o colágeno tipo I e o verde para quantificar o colágeno tipo III. A análise radiográfica e histológica sempre ocorre em etapas onde a primeira é a seleção da área da imagem a ser estudada. Há uma clara interferência do usuário nesta fase visto que é feito à mão livre e requer visualização perfeita do que necessita ser estudado. Após a seleção da área de estudo na imagem, no SAMMDENSO a próxima etapa é quantificação dos níveis de cinza do calo periosteal na área selecionada e após isto é concluído o estudo radiográfico. No SAMMPCR após a seleção da área da imagem a ser estudada seis etapas deverão ocorrer. Quatro delas para quantificar o colágeno tipo I e duas para quantificar o colágeno tipo III. Antes de determinar a densidade de área de cada cor (espectros de cores nos tons vermelho, amarelo e verde) o programa apresenta uma fase intermediária em que é possível realizar ajustes através de canais R (*Red*), G (*Green*) e B (*Blue*) do sistema RGB pois pode ocorrer a predominância ou não de determinada cor na área de estudo selecionada de forma comparativa com imagem inicial prévia a seleção da região de interesse. Esta fase requer observação rigorosa do usuário que deve ponderar a necessidade ou não de ajustes para aumentar ou diminuir as áreas nos tons vermelho, amarelo ou verde na região em estudo sempre em comparação com a imagem inicial. Concluída esta fase é só quantificar a densidade de área do colágeno tipo I (vermelho + amarelo) e III (verde).

Os bisfosfonatos são agentes farmacológicos utilizados para o tratamento da perda óssea devido à osteoporose, hipercalcemia maligna, doença metastática óssea, doença de *Paget*, mieloma múltiplo, na osteogênese imperfeita e baixa densidade óssea. Eles promovem a melhoria da qualidade óssea em situações em que existe um desequilíbrio na formação óssea mediada por osteoblasto e a reabsorção óssea mediada por osteoclasto. Ligam-se ao mineral ósseo, cristais de hidroxapatita, e deprimem a reabsorção óssea por atuar na célula responsável por esta ação, os osteoclastos, que são levados à apoptose. Os bisfosfonatos portanto são agentes farmacológicos anticatabólicos em especial aqueles com radical R2 nitrogenado que possui maior capacidade anti-absortiva (LITTLE *et al*, 2007; DRAKE, CLARKE, KHOSLA, 2008).

Em trabalho *in vitro* com osteoclastos humanos (NEUTZSKY-WULFF *et al*, 2010) mostraram que diferentes inibidores das funções dos osteoclastos têm diferentes alterações na qualidade dos osteoclastos e secundariamente deixando diferentes qualidades ósseas. Neste mesmo estudo o Ibandronato de sódio mostrou-se um potente inibidor da reabsorção orgânica e inorgânica reduzindo o número de osteoclastos maduros.

A partir de trabalhos com modelos caninos em que era realizado artroplastias do quadril e usado bisfosfonatos como terapia para inibir a reabsorção óssea, foi levantada uma hipótese de efeito anabólico dos bisfosfonatos (alendronato e residronato) e posteriormente sustentado a hipótese em estudo *in vitro* com osteoblastos humanos no qual estes fármacos melhorariam a proliferação e maturação destas células como também a expressão gênica da proteína morfogenética óssea (BMP-2), colágeno tipo I e osteocalcina (IM *et al*, 2004). Já o estudo *in vitro* de Koch *et al* (2010) com osteoblastos humanos sugerem que bisfosfonatos (zoledronato, Ibandronato, clodronato) tem limitado efeito antiproliferativo (com exceção do zoledronato) nestas células, e que há um aumento da expressão gênica de colágeno tipo I da matriz extracelular pelo provável estímulo da diferenciação dos osteoblastos.

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo e sua família é composta por mais de vinte tipos geneticamente diferentes. São classificados segundo sua estrutura e função e dentre os colágenos que formam longas fibrilas estão os tipos I, II, III, V e XI. De longe o colágeno tipo I é o mais abundante, é amplamente distribuído no organismo. O colágeno tipo I é espesso altamente birrefringente e as fibrilas são não argirófilas, a pele, os tendões, ossos e a dentina são os tecidos representativos. Têm como principal função à tensão. O tipo III freqüentemente se associa com o tipo I, tem como função a manutenção da estrutura de órgãos expansíveis. Ele é fino fracamente birrefringente e as fibrilas são argirófilas. Pele, músculo, vasos sanguíneos são os tecidos representativos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As fibras de colágenos tipo I, II e III, na consolidação das fraturas, têm a importante função de dar força mecânica e suporte aos tecidos. Durante o processo de consolidação, os tipos I e III formam uma trama para adesão e migração das células. A secreção e distribuição dos colágenos no reparo das fraturas é reflexo destas funções. O tecido fibroso contém primariamente colágeno tipo III que serve como substrato para migração de células osteoprogenitoras e neoformação de capilares. Nos estágios iniciais (seis dias) da consolidação de fraturas no rato, o colágeno tipo III predomina. Com a presença de osso trabecular há secreção de grande quantidade de colágeno tipo I (ASHHURST, PHIL, 1990).

No presente estudo o ibandronato de sódio proporcionou maior densidade de colágeno tipo I nas duas primeiras semanas da consolidação óssea, tanto no calo ósseo como na cortical próxima ao foco de fratura, e diminuição na densidade do colágeno tipo III na primeira semana da consolidação óssea quando comparada com o grupo controle. O trabalho de Rocha (2011) com o mais potente bifosfonato, o ácido zoledrônico, usando a mesma metodologia para avaliar a consolidação óssea que foi usada no presente estudo, concluiu que o ácido zoledrônico aumentou significativamente a porcentagem de colágeno tipo I no calo ósseo na quarta semana de consolidação óssea. São trabalhos realizados com bifosfonatos de potência anti-absortivas diferentes que promovem um incremento na densidade de colágeno tipo I no reparo ósseo em fases diferentes da consolidação óssea.

No estudo do calo periosteal foi possível constatar que no grupo Ibandronato a área do calo na quarta e sexta semana de consolidação óssea era significativamente maior que a área do calo ao final da primeira semana, embora não promovesse um calo periosteal estatisticamente maior que o grupo controle. No estudo da densidade óptica, o grupo Ibandronato foi estatisticamente maior no dia 42 que o grupo Controle, isto é, a média dos níveis de cinza confirma que o Ibandronato de sódio promoveu maior mineralização (opacidade) do calo ósseo na fase final da consolidação óssea. No estudo com ácido zoledrônico, a área do calo ósseo não apresentou diferenças estatísticas com o grupo Controle porem, as áreas do calo ósseo periosteal do grupo Zoledronato na segunda e quarta semanas foram maiores que dia 7 e a densidade óptica do calo ósseo na análise intragrupo e intergrupo não apresentou diferenças estatísticas (Rocha, 2011). Embora o ibandronato de sódio apresente potência anti-absortiva relativa menor que o ácido zoledrônico, ele parece proporcionar um mesmo comportamento quanto ao tamanho da área e a densidade óptica do calo periosteal nas quatro primeiras semanas de consolidação óssea. GUARNIERO *et al.* (2007), em estudo com coelhos em que foi realizado osteotomia na fíbula, o ibandronato de sódio dose única via oral, promoveu um aumento na porcentagem relativa de osso nos calos ósseos pós-osteotomias em comparação com o grupo controle com trinta dias de evolução. Os resultados mostraram que as densitometrias ósseas dos calos ósseos não apresentavam diferenças estatísticas entre os coelhos que receberam Ibandronato de sódio e os que receberam água destilada. Apesar da metodologia diferente para analisar a densidade óssea observa-se que com quatro semanas a mineralização do calo não tinha diferença estatística significativa com o grupo controle.

Estudar a consolidação de fraturas em modelos animais é tarefa complexa. São muitos os fatores que podem influenciar positivamente ou negativamente no estudo alterando os resultados. Nesse estudo utilizamos uma técnica moderna de quantificação do colágeno e da área do calo ósseo periosteal. O SAAM é um *software* que avalia imagens que se não forem completas, de boa qualidade e em padrão ouro, não poderão representar a imagem mais próxima da realidade para uma aferição. Julgo ser importante considerar a possibilidade de melhorar a realização das imagens radiográficas e histológicas. As radiografias foram feitas em uma só incidência o que não possibilitou uma melhor avaliação do calo ósseo. Diferenças nos padrões de coloração das lâminas puderam interferir na quantificação do colágeno tipo III que apresentou resultados atípicos no grupo Controle, o estudo de apenas segmentos do calo ósseo e de cortical próxima a fratura pode subestimar o tamanho, a densidade e constituição de todo o calo ósseo. A avaliação dos efeitos do fármaco foi realizada apenas com uma dosagem para estudar um evento tão complexo, e assim mesmo, o grupo Controle não recebeu o mesmo veículo que foi utilizado para diluir o ibandronato de sódio. Apesar dos resultados ora aqui encontrados, é necessário a realização de outros estudos para melhor documentar a ação farmacológica do ibandronato de sódio na consolidação de fraturas.

6. CONCLUSÃO

A administração oral de Ibandronato de sódio 15mg/ kg, foi capaz de produzir efeitos na consolidação de fraturas de fêmur de ratos tratados com haste intramedular, pois proporcionou aumento na densidade do colágeno tipo I nas fases iniciais da consolidação das fraturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994. 620 p.

ASHHURST, D. E.; PHIL, D. Basic science and pathology collagens synthesized by healing fractures. **Clin Orthop Relat Res.**,v.255, p. 273-283,1990

AZUMA, Y.; ITO, M.; HARADA, Y.; TAKAGI, I.; OHTA, H.; JINGUSHI, S. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various Cellular reactions in the fracture callus. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 4, p.671-680, 2001.

BARRETT ,J.; WORTH, E.; BAUSS, F.; EPSTEIN, S. Ibandronate: A Clinical Pharmacological and Pharmacokinetic Update. **J Clin Pharmacol.**, v. 44, n.9, p.951-965, 2004.

BAUSS, F.; DEMPSTER, D.W. Effects of ibandronate on bone quality: preclinical studies. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 265–273, 2007.

BAUSS,F.; LALLA,S.; ENDELE,R.; HOTHORN,L.A. Effects of Treatment with Ibandronate on Bone Mass,Architecture, Biomechanical Properties, and Bone Concentration of Ibandronate in Ovariectomized Aged Rats. **J Rheumatol.**, v. 29, n.10, p.2200-2208, 2002.

BAUSS ,F.; SCHENKC, R. K.; HÖRTA, S.; MÜLLER-BECKMANN, B.; Sponer,G. New model for simulation of fracture repair in full-grown beagle dogs: Model characterization and results from a long-term study with ibandronate. **J Pharmacol Toxicol Methods.**, v. 50 , n. 1, p. 25– 34, 2004.

BONNARENS,F. ; EINHORN,T.A.; Production of a standard closed fracture in laboratory Animal bone. **J Orthop Res.**, v. 2, n. 1, p. 97-101, 1984.

CASTRO, P. C. F.; HOSHINO, A.; BRITO, R.B.; DIAS JÚNIOR, L. B.; BRITO, J. A. F.; BARROS, R. S. M.; SANTILI, C. Estudo do processo de consolidação óssea em ratos tratados com acetaminofen: avaliações radiográfica e histológica. **Rev Bras Ortop.** v. 40, n. 10, p. 614-620, 2005.

CHOW, D. HO-KIU; LEUNG, KWOK-SUI; QIN, LING; LEUNG, A. HON-CHI; CHEUNG, WING-HOI. Low-Magnitude High-Frequency Vibration (LMHFV) Enhances Bone Remodeling in Osteoporotic Rat Femoral Fracture Healing. **J Orthop Res.** 2010 Dec 23. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.21303/full> > Acesso em: 16 de jan. 2011.

COHEN, M.; MATTAR JUNIOR, R.; JESUS-GARCIA FILHO, R.; Traumatismo de membro inferior. In: _____. **Tratado de ortopedia.** 1.ed.São Paulo: Roca, 2007. Cap. 93, p.707-709

DOOLEY, M.; BALFOUR, J.A. Ibandronate: New Drug Profile. **Drugs**, v. 57, n. 1, p. 101-108,1999.

DRAKE,M.T.; CLARKE,B.L.; KHOSLA,S. Bisphosphonates: Mechanism Of Action And Role In Clinical Practice. **Mayo Clin Proc.**, v. 83, n. 9, p. 1032-45, 2008.

EBERHARDT, C.; HABERMANN, B.; MÜLLER, S.; SCHWARZ, M.; BAUSS, F.; KURTH, A. H.A. The bisphosphonate ibandronate accelerates osseointegration of hydroxyapatite-coated cementless implants in an animal model. **J Orthop Sci.**, v. 12, n. 1, p. 61–66, 2007.

EINHORN, T. A. The science of fracture healing. **J Orthop Taruma.** v. 19, n.10, supplement, p. S4-S6, 2005.

GIORDANO, M.; TAMANINI, A.; GIORDANO NETO, V.; APFEL, M. I. R.; ELIAS, N.; GRAÇA, R.; IKNACKFUSS, I. Influência da enoxaparina na consolidação das fraturas: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop.** v. 34, n. 3, p. 208-213, 1999.

GOSS-SAMPSON, M. A.; KRISS, A. Effects of pentobarbital and ketamine-xilazine anaesthesia on somatosensory, brainstem auditory and peripheral sensory- motor responses in the rat. **Lab Anim.** v. 25, n. 4, p. 360-366, 1991.

GREENSPAN, A. Traumatismos. In: _____. **Radiologia ortopédica.** 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. Parte. II, p. 4.19-4.20.

GRUNDNES, O.; UTUVAG, S. E.; REIKERAS, O. Restoration of bone following fracture and reaming in rat femora. **Acta. Orthop. Scand.**,v. 65, n. 2, p. 185-190, 1994.

GUARNIERO, R.; CINAGAVA, M.Y.; SANTANA, P. J.; BATISTA, M. A.; OLIVEIRA, L. A. A.; RODRIGUES, C. J.; CINAGAVA, F. T. Influência do componente protéico na consolidação de fraturas: trabalho experimental em ratos. **Acta Ortop Bras.** v. 11, n. 4, p. 206-210, 2003.

GUARNIERO, R.; MOLIN, R. E. D.; VAZ, C. E. S.; SANTANA, P. J.; CINAGAWA, F. T.; TATIBANA, W. S. Avaliação do efeito da glicosamina e condroitina na consolidação de fratura: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop.** v. 42, n.7, p. 201-205, 2007.

GUARNIERO, R.; VAZ, C. E. S.; SANTANA, P. J. D.; MOLIN, E. D.; BRAUN, J.; HARADA, M. S. Avaliação do efeito do ibandronato na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos. **Rev Bras Ortop.** v. 42, n. 8, p. 254-60, 2007.

HEBERT, S.; BARROS FILHO, T. E. P.; XAVIER, R.; PARDINI JUNIOR, A. G. Fraturas diafisárias do fêmur no adulto. In:_____. Ortopedia e traumatologia: princípios e prática 4.ed. Porto Alegre: Artemed, 2009. cap. 61, p. 1363-1379.

IM, G. I.; QURESHI, A.; KENNEY, J.; RUBASH, H. E.; SHANBHAG, A. S. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials.** v. 25, n. 18, p. 4105-4115, 2004.

JANG, H.S; JANG, I. S.; LEE, M. G. The effects of tramadol on electroencephalographic spectral parameters and analgesia in rats. **Korean J Physiol Pharmacol,** v.14, n. 3, p. 191-198, 2010.

JAMACARU, F. V. F. **Quantificação de angiogênese corneana in vivo através do processamento de imagens digitais,** 2006, 242p. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In:_____.**Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 5, p. 102-103.

_____. Tecido ósseo. In:_____.**Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 8, p. 135-152.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.** v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KOCH, F. P.; YEKTA, S. S.; MERKEL, C.; ZIEBART, T.; SMEETS, R. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression *in vitro*. **Head Face Med.** v. 6, n. 12, 2010. Disponível em: <[HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912253/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912253/)>. Acesso em: 8 mar. 2011.

KUPCZIK, F.; VIALLE, L. R. G.; NOBRE, L. O.; VIEIRA, L. A.; FERNANDES, A. E. O.; Influência da ciprofloxacina na consolidação óssea de fraturas de fêmur em ratos. **Acta Ortop Bras.** v. 17, n. 4, p. 228-31, 2009.

KURTH, A. H. A.; KIM, S.-Z.; SEDLMAYER, I.; HOVY, L.; BAUS, F. Treatment with ibandronate preserve in experimental tumour-induced bone loss. **J Bone Joint Surg. (Br)**, v. 82-B, n. 126, p. 126 – 130, 2000.

LALLA, S.; HOTHORN, L. A.; HAAG, N.; BADER, R.; BAUSS, F. Lifelong administration high doses of ibandronate increases bone mass and maintains bone quality of lumbar vertebrae in rats. **Osteoporos Int.**, v. 8, n. 2, p. 97-103, 1998.

LITTLE, D. G.; RAMACHANDRAN, M.; SCHINDELER, A. The anabolic and catabolic responses in bone repair. **J. Bone Joint Surg. (Br)**, v. 89-B: p. 425-433. 2007.

MAINARDES, K. C.; NETTO, R. V.; DONOSO, C. P. M.; KUME, P. K. ; KUME, K. Y. ; BUSATO, T. S. Efeito do diabetes associado ao envelhecimento na consolidação de fraturas na tíbia de ratos. **Rev Bras Ortop.** v. 42, n. 3, p. 55-63, 2007.

MALTA, M. C.; REIS, F. B.; MORALES, D. R.; SOUZA, N. R. Tratamento das fraturas diafisárias do fêmur com a haste intramedular bloqueada desenvolvida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. **Rev Bras Ortop.** v. 37, n. 7, p. 270-280, 2002.

MANCINI, I.; DUMON, J. C.; BODY, J. C. Efficacy and safety of ibandronate in the treatment of opioid-resistant bone pain associated with metastatic bone disease: a pilot study. **J. Clin Oncol** .,v. 22, n. 17, p. 3587-3592, 2004.

MENDES, P. H. B.; SCOFANO JUNIOR, A. R. ; SILVA, M. G. S.; SOUZA, I.; SILVA FILHO, N. M.; ABREU, A. V.; ELIAS, N.; APFE, M. I. R. Consolidação da fratura após o uso prolongado de corticóide: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop.** v. 36, n. 9, 2001.

MESQUITA, C. J. G.; LEITE, J. A. D.; FECHINE, F. V.; ROCHA, J. L. C.; LEITE, J. G. S.; LEITE FILHO, J. A. D.; BARBOSA FILHO, R. A. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. **Burns.** v. 36, n. 1, p. 97-108, 2010.

MORRIS, C. D.; EINHORN, T. A. Bisphosphonates in orthopaedic surgery. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 7, p. 1609-1618, 2005.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Men Inst Oswaldo Cruz**. v. 86, supplement 3, p. 1- 11, 1991.

MOTULSKY, H. **Intuitive biostatistics**. Oxford: Oxford University Press, 1995. 386 p.

MUSSI FILHO, S.; VIDIGAL, L.; CANOVA, R. A.; CRUZ, H. A.; ZANIOLO, F. J.; VIALLE, L. R. G. Estudo experimental dos efeitos da heparina de baixo peso molecular (enoxaparina) na formação de calo ósseo em fêmures de ratos. **Acta ortop Bras**. v. 14, n. 2, p. 78-82, 2006.

NEUTZSKY-WULFF, A.V.; SØRENSEN, M.G.; KOCIJANCIC, D.; LEEMING, D. J.; DZIEGIEL, M. H.; KARSDAL, M. A.; HENRIKSEN, K. Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption-implication for osteoclast quality. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 11, n. 109, 2010.

NUNAMAKER, D.M. Experimental models of fracture repair. **Clin Orthop Relat Res**. v. 355, supplement, p. S56-S65, 1998.

POUTOS, I.; GEORGOULI, T.; BLOKHUIS, T.J.; PAPE, H.C.; GIANNOUDIS, P.V. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: What is the evidence? **Injury** v. 39, n. 4, p. 384 – 394, 2008.

POZENATO, L. C.; SANTANA, P. J.; GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L. A. A.; DOMINGUESE, I. J. B. L.; Efeitos da ipriflavona sobre a consolidação de fraturas em ratas com desnutrição protéica: trabalho experimental. **Rev Bras Ortop** vl. 39, n. 7, p. 390-397, 2004.

REGINSTER, J-Y.; FELSEBERG, D.; COOPER, C.; STAKKESTAD, J. A.; MILLER, P.D.; KENDLER, D. L.; ADAMI, S.; MCCLUNG, M. R.; BOLOGNESE, M. A.; CIVITELLI, R.; DUMONT, E.; BONVOISIN, B.; RECKER, R.R.; DELMAS, P. D. A new concept for bisphosphonate therapy: a rationale for the development of monthly oral dosing of ibandronate. **Osteoporos Int**, v. 17, n 2, p. 159–166, 2006.

REIS, F. B. Fraturas da diáfise e fêmur distal. In:_____. **Fraturas**. Campinas: Autores Associados, 2000. cap. 5, p. 243-256.

ROCHA, S. N. C. **Efeitos do ácido zoledrônico na consolidação de fraturas da diáfise femoral de ratos tratados com haste intramedular**, 2011, 66p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

RÜEDI, T.P.; MURPHY, W.M. Classificação de fraturas: Significado biológico. In: _____ . **Princípio AO do tratamento de fraturas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. cap. 1.4, p. 45-57.

RUSSEL, R. G. G.: Ibandronate: Pharmacology and preclinical studies. **Bone**, v. 38, n. 4, Supplement 1, p. S7-S12, 2006.

SBOT. Fraturas de diáfise de fêmur. In: _____. **Traumatologia ortopédica**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap. 21, p. 237-242.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Semin Cell Deve Bio**, v. 19, n. 5, p. 459–466, 2008.

SHETH, N. P.; LONNER, J. H. Fixação das fraturas da diáfise femoral com haste intramedular. In: _____. **Guia de procedimentos em ortopedia: As principais cirurgias**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2010. cap. 24, p. 271-285.

STANNARD, J. P.; SCHMIDT, A. H.; KREGOR, P. J. Fraturas da diáfise do fêmur. In: _____. **Tratamento cirúrgico do trauma ortopédico**. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 25, p. 650-671.

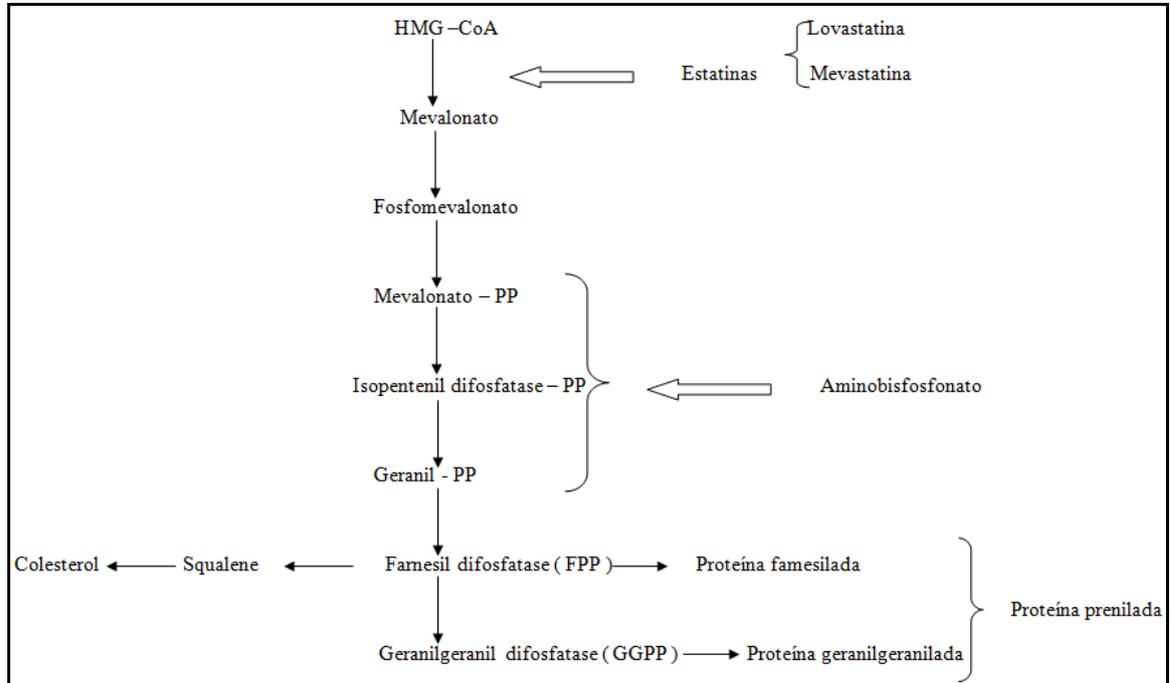
TEIXEIRA, D. F. G. **Efeitos do carbonato de lodenafil na consolidação de fraturas da diáfise femoral de ratos tratados com haste intramedular**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

TENGVALL, P.; SKOGLUND, B.; ASKENDAL, A.; ASPENBERG, P. **Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats**. *Biomaterials* v. 25, n.11, p. 2133 – 2138, 2004.

UDUPA, K.N.; PRASAD, G. C.; Chemical and histochemical studies on the organic constituents in fracture repair in rats. **J Bone Joint Surg (Br)**, v. 45-B(4), n. 4, p. 770-779, 1963.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R.; BOECHAT, R.; BLEY, J. P.; SCUSSIATO, R.; BUSATO, T.; CARVALHO, D.; FEDATTO, F.; FERNANDES, B.; TORRES, R. Produção de fratura padronizada de fêmur em ratos. **Rev Bras Ortop.** v. 39, n. 6, p. 323-329, 2004.

APÊNDICE A – Via do mevalonato. Adaptado de Morris e Einhorn, 2005:



**APÊNDICE B – Procedimento de preparo de substância aquosa de
ibandronato de sódio:**

1. Anotar o código do lote, data de fabricação e validade do medicamento presentes na caixa Bonviva®150mg
2. Verificar lacres e hologramas presentes na caixa de Bonviva® 150mg
3. Conferir se código do lote, data de fabricação e validade presentes na caixa Bonviva®150mg é igual ao código do lote, data de fabricação e validade presentes no *blister* de Bonviva® 150mg
4. Verificar a integridade do *blister* de Bonviva® 150mg
5. Pesar em balança de precisão o comprimido revestido de Bonviva® 150mg
6. Macerar o comprimido revestido de Bonviva® 150mg em almofariz pequeno usando pistilo.
7. Tarar a balança de precisão com recipiente de papel alumínio.
8. Transpor comprimido revestido de Bonviva®150mg macerado para recipiente de papel alumínio.
9. Tarar a balança de precisão com *eppendorf* escuro
10. Retirar do recipiente de papel alumínio porção do comprimido revestido de Bonviva® 150mg macerado a quantidade calculada para preparo de solução para nove animais e acondicioná-lo em *eppendorf* escuro:

$$\text{massa do comprimido para nove animais} = (\text{massa do comprimido} \times 54) \div 150$$
11. Diluir a massa do comprimido para nove animais que está acondicionada no *eppendorf* escuro em 9ml de água pura.
12. Administrar por gavagem a cada animal o volume da solução segunda fórmula:

$$\text{Volume a ser administrado} = \text{massa do animal} \div 400.$$

Dosagem terapêutica	Dose por animal de 400g	Dose para 9 animais	Massa do comprimido	Massa para solução de nove animais em mg	Volume da solução em ml	Volume a ser administrado em ml
15mg/Kg	6mg	54mg	MC (mg)	$MC \times 54 \text{mg} \div 150 \text{mg}$	9ml de água pura	MR/400g

MC= Massa do comprimido revestido de bonviva® . MR= Massa do animal em gramas

APENDICE C–APARELHO DE FRATURAS

A base é o componente mais inferior do aparelho, mede 299 mm x 177 mm, e fixada no seu centro encontra-se a plataforma (D). Esta mede 44 mm x 43,4 mm x 80 mm, e contém na extremidade superior dois canaletes dispostos 90° entre si, um transverso (D1), medindo 43,4 mm x 11,4 mm x 8,6 mm e um longitudinal (D2) medindo 44 mm x 11,3 mm x 9,3 mm. As hastes (B e C) são cilíndricas, ocas e polidas, medindo 395 mm x 19 mm cada, inferiormente estão fixadas verticalmente, paralelas, uma em cada extremidade do comprimento da base (A), e superiormente estão fixadas na barra de aço estabilizadora (H). A barra de aço estabilizadora (H) tem forma de paralelepípedo, é oca, mede 300 mm x 25,2 mm x 24,6 mm, tem dois orifícios um em cada extremidade do seu comprimento, na face inferior, medindo 20 mm de diâmetro, capaz de adaptar a extremidade superior das hastes cilíndricas (B e C) e dois orifícios, um em cada extremidade de sua largura, centralizado, com diâmetro de 6,9 mm capaz de receber parafuso com rosca a fim de fixar as hastes cilíndricas (B e C). Na face direita da barra de aço estabilizadora (H) e centralizada nela, encontra-se fixado um gancho, rudimentar, que funciona como trava anti-deslizamento da barra de aço deslizante. Chamaremos este gancho de trava (G). A barra de aço deslizante (E) é composta de três componentes. Um componente central e dois componentes laterais. O componente central tem formato de " T " medindo 167,5 mm x 23,5 mm x 5,0 mm, e na sua maior largura mede 63,5 mm. Possui 4 orifícios, dois em cada extremidade, para realizar a conexão com os componentes laterais através de um sistema de parafuso e dupla porca. Centralizado e na sua face direita há uma argola para permitir o engate do gancho da trava. Na face esquerda existe uma peça de metal retangular, com orifício central, funcionando como massa adicional a barra de aço deslizante, em que é fixada com parafuso e porca sextavada. O prolongamento da largura do componente central da barra de aço é a lâmina romba (F) que mede 6,0 mm x 23,5 mm x 5,0 mm e proporciona o contato direto com a coxa do animal. Os componentes laterais tem uma extremidade em forma cilíndrica e oca medindo 1,81 mm de diâmetro e outra extremidade é semi-curva com dois orifícios para realizar a conexão com o componente central. As hastes cilíndricas (B e C) penetram no interior das extremidades cilíndricas da barra de aço deslizante permitindo suave movimento de sobe e desce.

APENDICE D – GRANDEZAS FÍSICAS DA AÇÃO DA BARRA DESLIZANTE

Grandezas (und.)	Valores Dados
Massa do peso M (kg)	0,746
Aceleração da Gravidade g (m/s ²)	9,81
Altura de queda d (m)	0,2743
Força com que a massa atinge a pata. F (N) = Peso de M	7,32
Trabalho realizado W = Energia cinética Ec (N.m ou Joule J)	2,01
Velocidade v com que M atinge a coxa do roedor (m/s)	2,32
Tempo de queda (s)	0,24

Fórmulas
Força com que a massa atinge a pata F (N) = Peso de M $F = \text{Peso} = M \cdot g$
Trabalho realizado W = Energia cinética Ec (N.m ou Joule J) $W(F) = E_c - E_p$. Como $E_p = 0 \rightarrow W(F) = E_c = M \cdot g \cdot d$
Velocidade v com que M atinge a coxa do roedor (m/s) $E_c = (M \cdot v^2) / 2 \rightarrow v = \text{raiz quadrada de } (2 \cdot M / v^2)$
Tempo de queda (s) $t = v / g$

APÊNCICE E – Dados brutos

Dados brutos : avaliação radiológica

Área do calo

	CONT.7D	IBAN.7D	CONT.14D	IBAN.14D	CON.28D	IBAN.28D	CONT.42D	IBAN.42D
RATO1	1,15	0,83	5,95	10,11	8,9	16,67	15,22	28,33
RATO2	0,66	0,65	28,24	7,29	18,61	15,08	8,65	17,59
RATO3	0,44	0,48	19,99	7,12	5,47	11,3	25,74	14,73
RATO4	0,65	0,46	5,28	6,15	12,8	3,16	11,6	14,43
RATO5	0,38	0,32	18,13	4,46	11,01	10,48	7,79	12,28
RATO6	0,59	0,54	12,32	5,79	5,38	12,34	8,63	15,64

Densidade óptica

	CONT.7D	IBAN.7D	CONT.14D	IBAN.14D	CON.28D	IBAN.28D	CONT.42D	IBAN.42D
RATO1	70,48	76,205	61,875	59,675	85,9	79,56	60,24	82
RATO2	59,365	65,405	93,385	75,67	68,91	70,39	54,655	90,21
RATO3	54,37	64,07	67,835	69,52	62,87	72,19	74,685	69,32
RATO4	63,18	56,685	62,98	89,8	74,3	65,225	62,74	69,35
RATO5	54,75	78,485	60,515	83,095	62,93	83,25	58,515	90,26
RATO6	60,235	63,39	62,31	96,82	66,58	75,32	70,7	88,58

Dadoa brutos : Avaliação histilógica

Densidade do colágeno tipo I no calo

	CONT.7D	IBAN.7D	CONT.14D	IBAN.14D	CON.28D	IBAN.28D	CONT.42D	IBAN.42D
RATO1	11,991	22,1645	9,868	51,6593	11,4658	43,6409	35,1477	54,3867
RATO2	3,72625	51,4286	2,67	43,4251	10,2126	42,0254	35,4716	43,7349
RATO3	9,4582	42,222	35,86	50,3002	48,0537	38,1602	56,4617	31,0465
RATO4	26,578	39,3993	28,37	45,4252	49,923	38,0365	12,1468	37,1308
RATO5	39,4416	38,0455	23,1	49,8177	38,6216	50,3177	41,6442	37,3935
RATO6	16,144	22,5178	7,093	56,63,86	65,6675	49,5616	36,4412	31,6557

Densidade do colágeno tipo I na cortical

	CONT.7D	IBAN.7D	CONT.14D	IBAN.14D	CON.28D	IBAN.28D	CONT.42D	IBAN.42D
RATO1	8,467	55,898	56,399	30,43	45,893	26,271	59,398	74,306
RATO2	7,5103	55,938	2,2355	67,379	30,362	67,999	69,217	52,504
RATO3	7,5817	54,918	36,294	75,456	69,743	63,554	60,729	49,433
RATO4	16,427	48,515	63,142	67,987	61,563	48,967	26,276	64,21
RATO5	65,815	66,139	66,53	58,879	61,46	50,575	58,277	60,643
RATO6	4,004	54,039	64,716	63,999	63,138	57,758	29,26	50,677

Densidade do colágeno tipo III no calo ósseo

	CONT.7D	IBAN.7D	CONT.14D	IBAN.14D	CON.28D	IBAN.28D	CONT.42D	IBAN.42D
RATO1	26,7605	0	10,704	1,49045	5,79055	4,1319	3,87395	0
RATO2	29,4185	0	22,089	0,0425	7,6118	0	3,54155	0,8016
RATO3	0,34605	0	0,0029	0,06795	0,0135	0,0172	0,0055	2,39165
RATO4	3,11955	0,022	5,9898	0,04235	0,9837	0,37955	23,6048	0
RATO5	1,79815	0,0028	4,6833	0,06505	0,00775	0	1,57125	0,2202
RATO6	5,67	0	15,563	0,05705	0	0,54405	34,3338	2,1562

Densidade do colágeno tipo III cortical

	CONT.7D	IBAN.7D	CONT.14D	IBAN.14D	CON.28D	IBAN.28D	CONT.42D	IBAN.42D
RATO1	44,45	0	56,399	19,847	12,55	17,676	10,025	2,2786
RATO2	48,984	0	2,2355	0,7076	28,871	0,7802	6,2759	9,3313
RATO3	8,9301	0	36,294	0,6848	0,005	0	0,0129	15,464
RATO4	39,325	0	63,142	0,5949	1,7252	4,9942	37,483	2,7718
RATO5	3,4801	0	66,53	4,1104	0,6298	1,0949	13,759	2,3652
RATO6	36,394	0,1764	64,716	10,957	0	6,6128	28,652	3,606

ANEXO A – Declaração de aprovação do Comitê de Ética Animal

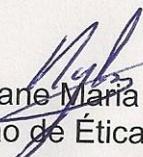
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n°01/08, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DO IBRANDONATO DE SÓDIO NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS NA DIÁFISE DOS FEMURES DE RATOS TRATADOS COM OSTEOSINTESE INTRAMEDULAR”**. de responsabilidade de Júlio César Chagas e Cavalcante, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 03 de setembro de 2009.

Fortaleza, 20 de janeiro de 2011


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

